

Date: June 27, 2003

Express Mail Label: EV 214949127 US

Inventors: Ryoichi Hashida, Shinji Kagaya, Yoshihiro Yayoi, Yuji Sugita  
and Hirohisa Saito

Attorney's Docket No.: 3462.1003-000

アレルギー性疾患の検査方法、および治療のための薬剤

#### FIELD OF THE INVENTION

本発明は、アレルギー性疾患に関連するNOR-1遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関する。

#### BACKGROUND OF THE INVENTION

アトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患は、多因子性の病気(multifactorial diseases)と考えられている。これらの病気は多くの異なる遺伝子の発現の相互作用によって起こり、これらの個々の遺伝子の発現は、複数の環境要因によって影響を受ける。このため、特定の病気を起こす特定の遺伝子を解明することは、非常に困難である。

またアレルギー性疾患には、変異や欠陥を有する遺伝子の発現や、特定の遺伝子の過剰発現や発現量の減少が関わっていると考えられている。病気に関して遺伝子発現が果たしている役割を解明するためには、遺伝子が発症にどのように関わり、薬剤などの外的な刺激が遺伝子発現をどのように変化させるのかを理解する必要がある。

近年の遺伝子発現の解析技術の発達により、多くの臨床試料で、遺伝子の発現を解析・比較することが可能となった。このような方法としては、ディファレンシャルディスプレイ(DD)法が有用である。ディファレンシャルディスプレイ法は、ライアンおよびパディー(Liang and Pardee)によって1992年に最初に開発された(Science, 1992, 257:967-971)。この方法を用いることによって、1回に数十種類以上のサンプルをスクリーニングすることができ、それらのサンプル中で発現が変化した遺伝子を検出することが可能である。このような方法を用いて、変異が生じた遺伝子や、時間や環境とともに発現が変わるような遺伝子を調べることによって、病因遺伝子の解明のために重要な情報がもたらされることが期待される。これらの遺伝子には、環境要因によって発現に影響を受けるような遺伝子も含まれる。

さて、現在アレルギー性疾患の診断においては、一般に、問診、家族歴、そして本人の既往症の確認が重要な要素となっている。またアレルギーをより客観的な情報に基づいて診断するために、血液を試料とする試験方法や、アレルゲンに対する患者の免疫学的な応答を観察する方法も実施されている。前者の例として、アレルゲン特異的IgE測定、白血球ヒスタミン遊離試験、あるいはリンパ球幼若化試験等が挙げられる。アレルゲン特異的IgEの存在は、そのアレルゲンに対するアレルギー反応の証明である。しかし患者によっては、必ずしもアレルゲン特異的なIgEを検出できるとは限らない場合もある。また、その測定原理上、診断に必要なアレルゲンの全てに対して、試験を実施しなければならない。白血球ヒスタミン遊離試験やリンパ球幼若化試

験は、免疫システムのアレルゲンに対する反応を *in vitro* で観察する方法である。これらの方法は、操作が煩雑である。

一方、患者を実際にアレルゲンに接触させたときに観察される免疫応答をアレルギーの診断に役立てる方法（後者）も公知である。プリック・テスト、スクラッチ・テスト、パッチ・テスト、皮内反応、あるいは誘発試験等が、この種の試験に含まれる。これらの試験では、患者のアレルギー反応を直接診断することができる反面、実際に被検者をアレルゲンに曝露する侵襲性の高い検査であると言えることができる。

この他、アレルゲンにかかわらず、アレルギー反応の関与を証明するための試験方法も試みられている。例えば、血清 IgE 値が高値である場合、その患者にはアレルギー反応が起きていると推定することができる。血清 IgE 値は、アレルゲン特異 IgE の総量に相当する情報である。アレルゲンの種類にかかわらず IgE の総量を決定することは容易であるが、非アトピー型気管支炎等の疾患を持つ患者では、IgE が低値となる場合がある。

好酸球数と ECP 値は、I 型アレルギーに引き続いて起きる遅延型反応や、アレルギー性炎症反応に関連する診断項目である。好酸球の数は、アレルギー症状の進展を反映するとされている。また、好酸球の顆粒に含まれるタンパク質である ECP (eosinophil cationic protein) も、喘息患者の発作に伴って強く活性化される。これらの診断項目は、確かにアレルギー症状を反映するものではある。しかし、実際に診断の指標とできる範囲は限られている。

従って、アレルゲンにかかわらず、アレルギー患者の病態の把握や治療方針の決定に役立てることができる診断指標が求められていた。患者に対する危険が少なく、しかも診断に必要な情報を容易に得ることができるアレルギー性疾患のマーカーは非常に有用である。アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することができれば、該遺伝子の発現を指標とすることにより、アレルギー性疾患の検査が可能となる。さらに、該タンパク質の細胞における機能が解明すれば、その機能に関する知見を基に、アレルギー性疾患の治療方法、および治療のための薬剤の開発が進むものと期待される。

#### SUMMARY OF THE INVENTION

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、アレルギー性疾患に関連する遺伝子を同定することにある。さらに、本発明は、該遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤を提供することを目的とする。

本発明者らは、既に確立された「蛍光 DD (Fluorescent DD) 法」(T. Ito ら, 1994, F EBS Lett. 351: 231-236) の手順に基づき、複数のヒトの血液から調製した白血球細胞 RNA サンプルを解析できる DD システムを開発した (特願平 11-120489)。そして

該システムを利用して、アレルギー性疾患特異的に発現量が異なる遺伝子の同定を試みた。

すなわち、まず本発明者らは、代表的なアレルギー性疾患であるアトピー性皮膚炎の患者について、皮膚炎症状の増悪期と寛解期とでアレルギー症状に関連するいくつかのパラメーターを比較した。その結果、一部の患者で寛解期における好酸球の減少が観察された。一般に好酸球は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床指標とされていることから、本発明者らはこの知見に着目した。そして、同一患者の増悪期と寛解期の間で、好酸球において発現レベルが変化する遺伝子を単離することができれば、アトピー性皮膚炎に直接的に関与する遺伝子の単離が可能となるものと考えた。

そこで、複数の被検者について、アトピー性皮膚炎の増悪期と寛解期に好酸球を採取して、前記システムを利用して好酸球で発現量が変化する遺伝子のスクリーニングを行った。その結果、寛解期に好酸球の減少が観察された患者において有意に高い発現量を示す配列「2250-01」の単離に成功した。ゲノムデータベース解析の結果、NOR-1 (MINOR) と呼ばれる核内オーファン受容体のイントロン部分であることが分かった。そこで、NOR-1 (MINOR) の報告されているエクソン配列について発現測定を行ったところ、イントロン部分で測定したときの結果と同様に、好酸球減少の見られた著効例の寛解期に誘導されるという傾向が見られた。NOR-1 遺伝子はこれまでのところ、アレルギー性疾患との関連については報告されていない。

アトピー性皮膚炎の治療による寛解期に末梢血好酸球で、アポトーティックな性格が示唆されるような遺伝子の亢進が見られるのは、末梢血好酸球数の減少とよく対応しており、NOR-1 遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いものと考えられる。

本発明の NOR-1 遺伝子の発現量を指標とすることにより、アレルギー性疾患を検査することが可能である。

また、NOR-1 受容体はオーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はこれまでのところ見つかっていなかった。本発明者らは、リガンドの探索のためのハイスループット系を開発し、この系を使用することにより NOR-1 の転写活性化作用を有すると考えられる化合物の取得に成功した。該化合物はシクロペンテン構造を持つプロスタグランジン (PGA 誘導体) であり、NOR-1 受容体の生体内リガンドである可能性が考えられた。また、該受容体のリガンド結合ドメイン (LBD) 領域を欠失させた変異体を用いた実験から、プロスタグランジン誘導体が実際に該受容体の LBD 領域に作用して働くことが示唆された。さらに、ビアコアを利用した実験から、PGA 誘導体が NOR-1 へ結合することが証明された。

即ち本発明者らは、アレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能であること、および、PGA 誘導体が NOR-1 のリガンド活性物質であることを見出した。

さらに本発明者らは、ファーマコフォアモデルにより、PGA 誘導体の NOR-1 リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートし、PGA 誘導体のレポーター系における構造活性相関情報から、結合ポケットに適合する PGA 誘導体以外の化合物をデータベースより選択した。これらの化合物は、NOR-1 受容体のリガンドとして機能することが期待される。

NOR-1 遺伝子の発現を誘導する化合物、あるいは NOR-1 受容体と結合し、転写活性を促進する化合物（例えば、リガンド活性物質）は、アレルギー性疾患に対する治療効果が期待される。

また本発明者らは、好酸球 CD30 に対するアゴニスト活性をもった抗 CD30 抗体で細胞のアポトーシス刺激を行ったところ、培養末梢血好酸球中で NOR-1 の発現が劇的に誘導されることを初めて見出した。このことから、好酸球 CD30 リガンド刺激によって、NOR-1 遺伝子の発現を上昇させ、好酸球における Nor1 の下流遺伝子の発現を制御することによって好酸球のアポトーシスを誘導することを機序とするアレルギー性疾患治療薬が提供される。

さらに本発明者らは、ヒト NOR-1 遺伝子をアクチンプロモーターによって発現誘導させたトランスジェニックマウスを確立することに成功した。このマウスは、NOR-1 を介したアレルギー疾患の解析のための動物モデルとして非常に有用である。

本発明は、アレルギー性疾患時、特に好酸球の減少を伴う寛解期において高い発現を示す NOR-1 遺伝子の発現を指標としたアレルギー性疾患の検査方法、およびアレルギー性疾患治療薬候補化合物のスクリーニング方法、並びにアレルギー性疾患の治療のための薬剤に関し、より具体的には、

〔1〕 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法、

（a）被検者の好酸球細胞における、NOR-1 受容体タンパク質、または前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

（b）健常者の好酸球細胞における前記タンパク質または遺伝子の発現レベルと比較する工程

〔2〕 遺伝子の発現レベルを、cDNA の PCR によって測定する、〔1〕に記載の検査方法、

〔3〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔1〕または〔2〕に記載の検査方法、

〔4〕 NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも 15 塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬、

〔5〕 次の工程（1）および（2）を含む、候補化合物が下記（a）または

（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

(1) 下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

5 (b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(2) 前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程

10 [6] 細胞が株化白血球細胞である [5] に記載の方法、

[7] 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が下記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

(a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

15 (b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

(1) 被検動物に候補化合物を投与する工程、および

20 (2) 被検動物の好酸球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程

[8] [5] ~ [7] のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

25 [9] 次の工程 (1) および (2) を含む、候補化合物が NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法、

(1) NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有する DNA を含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および

30 (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程

[10] [9] に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法、

35 [11] 次の工程 (1) ~ (3) を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

- (1) NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程
- (2) NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程
- (3) NOR-1 受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工程

5   〔12〕 次の工程(1)～(4)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法、

(1) NOR-1 受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得るDNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合するDNA配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有するDNA、を導入した細胞を提供する工程

- 10   (2) 前記細胞と被検化合物を接触させる工程
- (3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程

〔13〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬、

- 15   〔14〕 〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬、

〔15〕 NOR-1 受容体のリガンドを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬、

- 20   〔16〕 NOR-1 受容体のリガンドが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである、〔15〕に記載のアレルギー性疾患治療薬、

〔17〕 シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、プロスタグランジン<sub>A<sub>1</sub></sub>、16, 16-ジメチル プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、15(R)-15-メチル プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、17-フェニル トリノール プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン<sub>J<sub>2</sub></sub>、および8-イソ プロスタグランジン<sub>A<sub>1</sub></sub>からなる群より選択される、

- 25   〔16〕に記載のアレルギー性疾患治療薬、

〔18〕 NOR-1 受容体のリガンドが、表14～58に掲載されたいずれかの化合物である、〔15〕に記載のアレルギー性疾患治療薬、

- 30   〔19〕 アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、〔13〕～〔18〕のいずれかに記載の治療薬、

〔20〕 下記の(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー性疾患モデル動物、

- 35   (a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド

(b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド

5     〔21〕   トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である〔20〕に記載のモデル動物、

      〔22〕   細胞におけるNOR-1 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法、

10     〔23〕   〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、〔22〕に記載のアポトーシス誘導方法、

      〔24〕   細胞が好酸球細胞である、〔22〕または〔23〕に記載のアポトーシス誘導方法、

15     〔25〕   〔10〕～〔12〕のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤、

      〔26〕   NOR-1 受容体のリガンドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤、

20     〔27〕   NOR-1 受容体のリガンドが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである、〔26〕に記載のアポトーシス誘導剤、

      〔28〕   シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、プロスタグランジン<sub>A<sub>1</sub></sub>、16, 16-ジメチル プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、15(R)-15-メチル プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、17-フェニル トリノール  
25   プロスタグランジン<sub>A<sub>2</sub></sub>、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン<sub>J<sub>2</sub></sub>、および 8-イソ プロスタグランジン<sub>A<sub>1</sub></sub>からなる群より選択される、〔27〕に記載のアポトーシス誘導剤、

      〔29〕   NOR-1 受容体のリガンドが、表 1 4～5 8 に掲載されたいずれかの化合物である、〔26〕に記載のアポトーシス誘導剤、

30     〔30〕   好酸球 CD 3 0 受容体のリガンドを含む、NOR-1 遺伝子発現誘導剤、を提供するものである。

#### BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

35     図 1 は、アトピー性皮膚炎患者（患者番号 1～7）の、増悪期と寛解期における β アクチンにより補正した 2250-01 発現量 (copy/ng RNA) を示す図である。

図 2 は、増悪期から寛解期に伴って好酸球数の減少する患者のみにおける、NOR-1 遺伝子の ORF 部位で測定した発現量を示す図である。

図 3 は、本発明者らによって構築された NOR-1 受容体のリガンド探索系を模式的に示す図である。X に NOR-1 の全長遺伝子またはリガンド結合部位、Y に retinoic acid X receptor (RXR)  $\alpha$  の全長遺伝子を挿入する。これらを NIH3T3 細胞に遺伝子導入し、誘導されてくるルシフェラーゼの活性を測定する。

図 4 は、NOR-1 受容体タンパク質の構造を模式的に示す図である。

図 5 は、図 3 のシステムを用いたときの prostaglandin  $A_2$  および prostaglandin  $A_1$  の NOR-1 転写活性化作用を示す図である。

図 6 は、ファーマコフォアモデルにより、PGA 誘導体の NOR-1 リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートした、ガンマモデルにおける 15(R)-15-メチル-プロスタグランジン  $A_2$  (15(R)-15-Methyl-Prostaglandin  $A_2$  in gamma model) の図である。

図 7 は、NOR-1 の LBD 欠失変異体による prostaglandin  $A_2$  の転写活性低下の結果を示すグラフである。△LBD が欠失変異体である。

図 8 は、ビアコア S51 を用いて NOR-1 の LBD に PGA1、PGA2 が結合する様子を捉えた図である。GST を比較対照として用いた。13, 14-dihydro-15-keto-PGA2 をネガティブコントロールとして使用した。

図 9 は、抗 CD30 抗体または抗 Fas 抗体によって、末梢血好酸球をアポトーシス刺激した場合の NOR-1 の発現誘導結果を示すグラフである。beta-アクチン補正值、GAPDH 補正值を示す。

図 10 は、好酸球特異的細胞株である AML14. 3D10 を抗 CD30 抗体、抗 Fas 抗体で処理した場合のアポトーシス誘導効果を示すグラフである。

図 11 は、好酸球特異的細胞株である AML14. 3D10 を抗 CD30 抗体または抗 Fas 抗体で処理した場合の NOR-1 の発現誘導を示すグラフである。

図 12 は、Nor1 を含む核内受容体 Nur サブファミリーによる好酸球細胞死によるアレルギー疾患治療の作業仮説を示す図である。

図 13 は、NOR-1 トランスジェニックマウスおよび野生型マウスの写真である。トランスジェニックマウスの特徴としては、体重が半分にまで減少すること、胸腺萎縮、脾臓萎縮などが観察された。

#### DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

本発明者らは、NOR-1 (MINOR) 遺伝子 (本明細書においては、単に「NOR-1」と記載する場合あり) が、アトピー性皮膚炎の患者の増悪期と寛解期との比較において、好酸球の減少を伴った寛解期にある患者の好酸球で発現量が増加することを見出した。



従って、NOR-1 遺伝子の発現レベルを指標することにより、被検者に対してアレルギー性疾患の検査を行うことができる。

本発明は、NOR-1 遺伝子の発現レベルを測定することを特徴とする、アレルギー性疾患の検査方法を提供する。

5 本発明の方法の好ましい態様においては、次の工程を含む。

(a) 被検者の好酸球細胞における、NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程

(b) 健常者の好酸球細胞における前記遺伝子の発現レベルと比較する工程

10 NOR-1 (MINOR) 受容体は、表 1 に示すような種々の呼び名を持った 3 つのサブファミリーを構成する核内オーファン受容体の  $\gamma$  タイプであり、種を超えて主として NOR-1 と呼ばれている。

表 1

	ヒ ト	マウス	ラット
$\alpha$	NAK-1(TR3)	nur77	NGFI-B
$\beta$	TINUR/NOT	Nurr1	RNR-1
$\gamma$	MINOR / CHN	TEC	NOR-1

15

これら NOR-1 (MINOR) 受容体タンパク質のアミノ酸配列、または該タンパク質をコードする遺伝子の塩基配列に関する情報は、当業者においては公知の各種遺伝子データベース等から容易に取得することができる。具体的には、ヒト NOR-1 受容体タンパク質をコードする遺伝子 (NOR-1 遺伝子) の塩基配列を配列番号：1 に、NOR-1 受容体タンパク質のアミノ酸配列を配列番号：2 に示す。

20

本発明において、アレルギー性疾患(allergic disease)とはアレルギー反応の関与する疾患の総称である。より具体的には、アレルゲンが同定され、アレルゲンへの曝露と病変の発症に深い結びつきが証明され、その病変に免疫学的な機序が証明されることと定義することができる。ここで、免疫学的な機序とは、アレルゲンの刺激によって白血球細胞が免疫応答を示すことを意味する。アレルゲンとしては、ダニ抗原や花粉抗原等を例示することができる。

25

代表的なアレルギー性疾患には、気管支喘息、アレルギー性鼻炎、アトピー性皮膚炎、花粉症、あるいは昆虫アレルギー等を示すことができる。アレルギー素因(allergic diathesis)とは、アレルギー性疾患を持つ親から子に伝えられる遺伝的な因子である。家族性に発症するアレルギー性疾患はアトピー性疾患とも呼ばれ、その原因と

30

なる遺伝的に伝えられる因子がアトピー素因である。アトピー性皮膚炎は、アトピー性疾患のうち、特に皮膚炎症状を伴う疾患に対して与えられた総称である。

本発明におけるアレルギー性疾患の検査とは、以下のような検査が含まれる。例えば、被検者がアレルギー性疾患を罹患しているか否かの検査、アレルギー性疾患を被り易い体質か否かの検査、またはアレルギー症状が改善に向かっているのかどうかを判断するための検査等が挙げられる。本発明の NOR-1 遺伝子は、特に好酸球の減少を伴った寛解期にあるアトピー性皮膚炎患者の好酸球で発現量の増加を示した。好酸球はアトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーであることから、その減少と関連する臨床マーカーは、治療効果の判定に有用である。より具体的には、NOR-1 遺伝子の発現の上昇は、好酸球の減少を伴ってアレルギー性疾患の改善が進んでいることを示している。

アトピー性皮膚炎の重症度と好酸球数は相関しており、好酸球数を積極的に減らすことは治療につながる可能性がある。数の減少に伴って好酸球に特異的に誘導されてくるこの遺伝子を測定するとともに、細胞の外から積極的に誘導するような方法や物質を見つけ出せば、アトピー性皮膚炎の新しい治療法及びそれを評価するための診断法につながる可能性がある。

本発明において、NOR-1 遺伝子の発現レベルとは、該遺伝子の mRNA への転写、並びにタンパク質への翻訳を含む。従って、本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、該遺伝子に対応する mRNA の発現強度、あるいは該遺伝子によってコードされるタンパク質の発現レベルの比較に基づいて行われる。

本発明のアレルギー性疾患の検査方法における NOR-1 遺伝子の発現レベルの測定は、当業者においては、公知の遺伝子解析方法に従って実施することができる。具体的には、例えば NOR-1 遺伝子にハイブリダイズする核酸をプローブとしたハイブリダイゼーション技術、または本発明の遺伝子にハイブリダイズする DNA をプライマーとした遺伝子増幅技術等を利用することができる。

本発明のアレルギー性疾患検査用試薬として用いられるプローブまたはプライマーとしては、配列番号：1 に記載の塩基配列からなるポリヌクレオチド、またはその相補鎖に相補的な少なくとも 15 ヌクレオチドを含むポリヌクレオチドを挙げることができる。ここで「相補鎖」とは、A:T (RNA の場合は U)、G:C の塩基対からなる 2 本鎖 DNA の一方の鎖に対する他方の鎖を指す。また、「相補的」とは、少なくとも 15 個の連続したヌクレオチド領域で完全に相補配列である場合に限られず、少なくとも 70%、好ましくは少なくとも 80%、より好ましくは 90%、さらに好ましくは 95% 以上の塩基配列上の相同性を有すればよい。塩基配列の相同性は、BLASTN 等のアルゴリズムにより決定することができる。

このようなポリヌクレオチドは、本発明のタンパク質をコードするポリヌクレオチドを検出、単離するためのプローブとして、また、本発明のポリヌクレオチドを増幅

するためのプライマーとして利用することが可能である。プライマーとして用いる場合には、通常、15bp~100bp、好ましくは15bp~35bpの鎖長を有する。また、プローブとして用いる場合には、本発明のポリヌクレオチドの少なくとも一部若しくは全部の配列を有し、少なくとも15bpの鎖長のDNAが用いられる。プライマーとして用いる場合、3'側の領域は相補的である必要があるが、5'側には制限酵素認識配列やタグなどを付加することができる。

なお、本発明における「ポリヌクレオチド」は、DNAあるいはRNAであることができる。これらポリヌクレオチドは、合成（単離）されたものでも天然のものでもよい。また、ハイブリダイゼーションに用いるプローブDNAは、通常、標識したものが用いられる。標識方法としては、例えば次のような方法を示すことができる。なお用語オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのうち、重合度が比較的低いものを意味している。オリゴヌクレオチドは、ポリヌクレオチドに含まれる。

- ・DNAポリメラーゼIを用いるニックトランスレーションによる標識

- ・ポリヌクレオチドキナーゼを用いる末端標識

- ・クレノーフラグメントによるフィルイン末端標識 (Berger SL, Kimmel AR. (1987) Guide to Molecular Cloning Techniques, Method in Enzymology, Academic Press; Hames BD, Higgins SJ (1985) Genes Probes: A Practical Approach. IRL Press; Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular Cloning: a Laboratory Manual, 2nd Edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press)

- ・RNAポリメラーゼを用いる転写による標識 (Melton DA, Krieg PA, Rebagliati MR, Maniatis T, Zinn K, Green MR. (1984) Nucleic Acid Res., 12, 7035-7056)

- ・放射性同位体を用いない修飾ヌクレオチドをDNAに取り込ませる方法 (Kricka LJ. (1992) Nonisotopic DNA Probing Techniques. Academic Press)

ハイブリダイゼーション技術を利用したアレルギー性疾患の検査は、例えば、ノーザンハイブリダイゼーション法、ドットブロット法、DNAマイクロアレイを用いた方法などを使用して行うことができる。さらには、RT-PCR法等の遺伝子増幅技術を利用することができる。RT-PCR法においては、遺伝子の増幅過程においてPCR増幅モニター法を用いることにより、本発明の遺伝子の発現について、より定量的な解析を行うことが可能である。

PCR遺伝子増幅モニター法においては、両端に互いの蛍光を打ち消し合う異なった蛍光色素で標識したプローブを用い、検出対象（DNAもしくはRNAの逆転写産物）にハイブリダイズさせる。PCR反応が進んでTaqポリメラーゼの5'-3'エクソヌクレアーゼ (exonuclease) 活性により同プローブが分解されると二つの蛍光色素が離れ、蛍光が検出されるようになる。この蛍光の検出をリアルタイムに行う。検出対象についてコピー数の明らかな標準試料について同時に測定することにより、PCR増幅の直線性のあるサイクル数で目的試料中の検出対象のコピー数を決定する (Holland, P.M.

et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7276-7280; Livak, K. J. et al., 1995, PCR Methods and Applications 4(6):357-362; Heid, C. A. et al., Genome Research 6:986-994; Gibson, E. M. U. et al., 1996, Genome Research 6:995-1001)。PCR 増幅モニター法においては、例えば、ABI PRISM7700 (PE バイオシステムズ社) を用いることができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、NOR-1 遺伝子によりコードされるタンパク質を検出することにより行うこともできる。このような検査方法としては、例えば、該遺伝子によってコードされるタンパク質に結合する抗体を利用したウェスタンブロッティング法、免疫沈降法、ELISA 法などを利用することができる。

10 この検出に用いる NOR-1 タンパク質に結合する抗体は、当業者に周知の技法を用いて得ることができる。本発明に用いる抗体は、ポリクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体 (Milstein C, et al., 1983, Nature 305(5934): 537-40) であることができる。例えば、本発明のタンパク質に対するポリクローナル抗体は、抗原を感作した哺乳動物の血液を取り出し、この血液から公知の方法により血清を分離する。ポリクローナル抗体としては、ポリクローナル抗体を含む血清を使用することができる。あるいは必要に応じてこの血清からポリクローナル抗体を含む画分をさらに単離することもできる。また、モノクローナル抗体を得るには、上記抗原を感作した哺乳動物から免疫細胞を取り出して骨髓腫細胞などと細胞融合させる。こうして得られたハイブリドーマをクローニングして、その培養物から抗体を回収しモノクローナル抗体と  
20 することができる。

NOR-1 タンパク質の検出には、これらの抗体を適宜標識して用いればよい。また、この抗体を標識せずに、該抗体に特異的に結合する物質、例えば、プロテイン A やプロテイン G を標識して間接的に検出することもできる。具体的な検出方法としては、例えば、ELISA 法を挙げることができる。

25 抗原に用いるタンパク質もしくはその部分ペプチドは、例えば NOR-1 遺伝子もしくはその一部を発現ベクターに組み込み、これを適当な宿主細胞に導入して、形質転換体を作成し、該形質転換体を培養して組み換えタンパク質を発現させ、発現させた組み換えタンパク質を培養体または培養上清から精製することにより得ることができる。あるいは、NOR-1 遺伝子によってコードされるアミノ酸配列の部分アミノ酸配列からなるオリゴペプチドを化学的に合成し、免疫原として用いることもできる。

30 本発明においては、被検者の好酸球細胞を試料とすることが好ましい。好酸球細胞は、末梢血から公知の方法によって調製することができる。すなわち、例えばヘパリン採血した血液を遠心分離によって分画し、白血球細胞を分離する。次に白血球細胞から、フィコールによる遠心分離等によって顆粒球細胞を分取し、更に CD16 抗体を用いた好中球のディプリーション等によって好酸球細胞を分離することができる。分離された好酸球を破壊してライセートとすれば、前記タンパク質の免疫学的な測定

ための試料とすることができる。あるいはこのライセートから mRNA を抽出すれば、前記遺伝子に対応する mRNA の測定のための試料とすることができる。好酸球のライセートや mRNA の抽出には、市販のキットを利用すると便利である。

- あるいは、好酸球の分離を行わず、全血や、末梢血白血球集団を対象として、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルを測定しても良い。この場合には、測定値の補正を行うことによって、細胞における遺伝子の発現レベルの変化を求めることができる。例えば好酸球に特異的に発現し、かつ細胞の状態にかかわらず発現レベルが大きく変動しない遺伝子（ハウスキーピング遺伝子）の発現レベルの測定値に基づいて、本発明において指標とすべき遺伝子の発現レベルの測定値を補正することができる。

また検出すべきタンパク質が分泌型のタンパク質である場合には、被検者の血液や血清などの体液試料に含まれる目的とするタンパク質の量を測定することによって、それをコードする遺伝子の発現レベルの比較が可能である。

- 本発明によるアレルギー性疾患の検査の結果、特にアトピー性皮膚炎等のアレルギー性疾患の患者において本発明の遺伝子の発現レベルが上昇している場合に、好酸球の減少を伴ってアレルギー症状の改善が進んでいるものと推定される。

また本発明は、下記の（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現レベルを低下させたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物に関する。

- （a）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。

（b）NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。

- 本発明において、発現レベルの低下とは、遺伝子の機能を実質的に消失させたノックアウト状態が含まれる。本発明において、遺伝子の機能が実質的に消失した状態とは、遺伝子の発現や、この遺伝子によってコードされるタンパク質の活性を見出すことができない状態を言う。遺伝子の発現レベルは、例えば実施例に示すような定量的な PCR により確認することができる。また翻訳産物であるタンパク質の活性が実質的に見出せないことは、正常な状態と比較することにより確認することができる。

- このようなトランスジェニック動物には、例えば遺伝子のコード領域に変異を導入し、人為的にアミノ酸配列の変異や終止コドンを生じさせて、本来のタンパク質の活性を発現できない状態とした動物などを示すことができる。アミノ酸配列の変異には、置換、欠失、挿入、あるいは付加を示すことができる。その他、遺伝子の転写調節領域を変異させることにより、本発明の遺伝子の発現そのものを調節することもできる。

特定の遺伝子を対象として、トランスジェニック動物を得る方法は公知である。すなわち、遺伝子と卵を混合してリン酸カルシウムで処理する方法や、位相差顕微鏡下で前核期卵の核に、微小ピペットで遺伝子を直接導入する方法（マイクロインジェクション法、米国特許第 4873191 号）、胚性幹細胞（ES 細胞）を使用する方法などに

- 5 よってトランスジェニック動物を得ることができる。その他、レトロウイルスベクターに遺伝子を挿入し、卵に感染させる方法、また、精子を介して遺伝子を卵に導入する精子ベクター法等も開発されている。精子ベクター法とは、精子に外来遺伝子を付着またはエレクトロポレーション等の方法で精子細胞内に取り込ませた後に、卵子に受精させることにより、外来遺伝子を導入する遺伝子組換え法である（M. Lavitrano et al. *Cell*, 57, 717, 1989）。

本発明のトランスジェニック動物は、ヒト以外のあらゆる脊椎動物を利用して作成することができる。具体的には、マウス、ラット、ウサギ、ミニブタ、ヤギ、ヒツジ、あるいはウシ等の脊椎動物において様々な遺伝子の導入や発現レベルを改変されたトランスジェニック動物が作り出されている。

- 15 本発明のトランスジェニック動物には、例えば、配列番号：1 に示す塩基配列からなるヒト NOR-1 遺伝子の非ヒト動物種におけるホモログの発現が抑止されたノックアウト動物が含まれる。ノックアウト動物の表現型を観察することにより、ノックアウトした遺伝子の働きを具体的に知ることができる。配列番号：1 に示す塩基配列からなる NOR-1 遺伝子は、ヒトにおいてアトピー皮膚炎の好酸球の減少を伴った寛解期における好酸球中で発現が上昇していた。従って、そのホモログをノックアウトした動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として有用である。

例えば、本発明によるノックアウト動物が皮膚炎を発症したり、何らかのアレルギー性疾患に関連した測定値の変化を示せば、それを回復させる作用を持った化合物を探索するスクリーニングシステムが構築できる。

- 25 ノックアウト動物の作製方法は公知である。例えばマウスにおいて、胚性幹細胞を用いて相同組換えを行い、一方の対立遺伝子を改変・破壊した胚性幹細胞を選別し、ノックアウト動物を作製する方法が公知である。例えば、受精卵に遺伝子を操作した胚性幹細胞を注入して、胚性幹細胞由来の細胞と胚由来の細胞が混ざったキメラ動物を得る。このキメラ動物（キメラとは、2 個以上の受精卵に基づいた体細胞で形成される単一個体をいう）と正常マウスを交配すると、一方の対立遺伝子の全てが改変・破壊されたヘテロ接合体を作製することができる。さらに、ヘテロ接合体同士を交配すれば、ホモ接合体が作製できる。本発明によるトランスジェニック動物は、これらヘテロ接合体と、ホモ接合体のいずれをも含む。

- 35 相同組換えとは、遺伝子組換え機構で塩基配列が同じ、または非常に類似している 2 つの遺伝子間で起こる組換えのことをいう。相同組換えを起こした細胞の選別には PCR を使用することができる。挿入遺伝子の一部と挿入が期待される領域の一部をブ

ライマーとして使った PCR 反応を行い、増幅産物ができた細胞で相同組換えを起こしていることが判明する。また、胚幹細胞で発現している遺伝子に相同組み換えを起こさせる場合には、導入遺伝子にネオマイシン耐性遺伝子を結合させておき、導入後に細胞をネオマイシン耐性にさせることにより選択することができる等、公知の方法およびそれらの変法を用いて容易に選択することができる。

本発明者らは、後述の実施例で示すように実際にヒト NOR-1 遺伝子をアクチンプロモーターで発現誘導させたトランスジェニック (TG) マウスを確立することに成功した。本発明のトランスジェニック動物の好ましい態様の一例として、上記 TG マウスを示すことができる。

本発明によるトランスジェニック動物は、後に述べるアレルギー性疾患の治療または予防のための医薬品のスクリーニングに加えて、アレルギー性疾患のメカニズムの解明、さらにはスクリーニングされた化合物の安全性の試験に有用である。

本発明によって、NOR-1 遺伝子の発現レベルが好酸球の減少を伴う寛解期にあるアトピー性皮膚炎患者の好酸球において、上昇することが明らかとなった。従って、好酸球細胞において NOR-1 遺伝子、または該遺伝子と機能的に同等な遺伝子の発現レベルを人為的に低下させた動物は、アレルギー性疾患のモデル動物として利用することができる。なお好酸球における発現レベルの低下とは、白血球集団全体における前記遺伝子の発現レベルの低下を含む。すなわち、前記遺伝子の発現レベルを低下させるのは好酸球のみである場合のみならず、白血球集団全体において前記遺伝子の発現レベルが低下している場合を含む。本発明において機能的に同等な遺伝子とは、通常、前記 (a) または (b) に記載した遺伝子のいずれかを意味する。より具体的には、本発明における機能的に同等な遺伝子として、NOR-1 をコードする遺伝子とストリンジェントな条件でハイブリダイズする遺伝子も挙げられる。本発明におけるストリンジェントな条件として、一般的には以下のような条件を示すことができる。例えば、4xSSC、65℃でハイブリダイゼーションさせ、0.1xSSC を用いて 65℃で 1 時間洗浄する。ストリンジェンシーを大きく左右するハイブリダイゼーションや洗浄の温度条件は、融解温度 ( $T_m$ ) に応じて調整することができる。 $T_m$  はハイブリダイズする塩基対に占める構成塩基の割合、ハイブリダイゼーション溶液組成 (塩濃度、ホルムアミドやドデシル硫酸ナトリウム濃度) によって変動する。従って当業者であれば、これらの条件を考慮して同等のストリンジェンシーを与える条件を実験または経験的に設定することができる。

本発明におけるモデル動物には、例えば前記トランスジェニック動物等を利用することができる。

更に本発明は、候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法を提供する。本発明において、NOR-1 遺伝子は、好酸球の減少を伴う寛解期にあるアトピー性皮膚炎患者の好酸球において有意に発現レベルが上昇してい

る。従って、これらの遺伝子の発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、その発現レベルを上昇させることができる化合物を選択することによって、アレルギー性疾患の治療薬を得ることができる。本発明において遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物とは、遺伝子の転写、翻訳、タンパク質の活性発現のいずれかのステップを誘導する作用を持つ化合物である。本発明はさらに、NOR-1 遺伝子の発現レベルに加えて、NOR-1 遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を検出する方法を提供するとともに、NOR-1 遺伝子産物タンパク質の活性（転写活性化能）を上昇させる化合物を選択することによって、アレルギーの治療薬を得ることができる。

候補化合物が本発明のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響の検出方法は、*in vivo*で行うことも *in vitro*で行うこともできる。*in vivo*での影響を検出するには、適当な被検動物を利用する。被検動物には、例えばアレルギー性疾患モデル動物や、前記（a）または（b）に記載の遺伝子の好酸球細胞における発現が抑制されたトランスジェニック非ヒト動物からなるアレルギー性疾患モデル動物を利用することができる。本発明に基づく *in vivo*での発現レベルに与える影響の検出は、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

（1）被検動物に候補化合物を投与する工程

（2）被検動物の好酸球細胞における前記（a）または（b）に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程

本発明の検出方法における被検動物としては、例えば、NOR-1 遺伝子のアンチセンスを発現させることにより NOR-1 遺伝子の発現を低下させたトランスジェニック動物を利用することができる。このようなトランスジェニック動物は、例えば以下のようにして作成することができる。すなわち、まず NOR-1 遺伝子の配列の全長配列もしくは部分配列を、適当なプロモーター配列の下流に逆向きの方向で組み込み、アンチセンス RNA 発現ベクターを構築する。この発現ベクターを核へ導入すれば、NOR-1 遺伝子のアンチセンスを発現し、NOR-1 遺伝子の発現が低下したトランスジェニック動物を得ることができる。発現ベクターに使用するプロモーターとして、適当な薬剤等の物質により転写が調節されるプロモーターを用いれば、該物質の投与によってトランスジェニック動物における NOR-1 遺伝子の発現レベルを調整することができる。

このようにして NOR-1 遺伝子の発現を低下させたモデル動物に薬剤候補化合物を投与し、モデル動物の好酸球における NOR-1 遺伝子の発現に対する化合物の作用をモニターすることにより、NOR-1 遺伝子の発現レベルに与える薬剤候補化合物の影響を検出することができる。

本発明のスクリーニング方法により、NOR-1 遺伝子の発現に様々な形で関与する薬剤を選択することができる。具体的には、例えば次のような作用点を持つ薬剤候補化合物を見出すことができる。

・ NOR-1 遺伝子の発現をもたらすシグナル伝達経路の活性化



- ・NOR-1 遺伝子の転写活性の上昇
- ・NOR-1 遺伝子の転写産物の安定化もしくは分解の阻害、等

また、*in vitro* においては、例えば、前記 (a) または (b) に記載した遺伝子を発現する細胞に候補化合物を接触させ、前記遺伝子の発現レベルを検出する方法を利用することができる。具体的には、例えば以下のような工程に従って実施することができる。

(1) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程

(2) 前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程

本発明において、工程 (1) に用いるための細胞は、これらポリヌクレオチドを適当な発現ベクターに挿入し、該ベクターを適当な宿主細胞に導入することにより得ることができる。利用できるベクター、および宿主細胞は、本発明の遺伝子を発現し得るものであればよい。宿主-ベクター系における宿主細胞としては、大腸菌、酵母、昆虫細胞、動物細胞等が例示でき、それぞれ利用できるベクターを適宜選択することができる。

ベクターの宿主への導入方法としては、生物学的方法、物理的方法、化学的方法などを示すことができる。生物学的方法としては、例えば、ウイルスベクターを使用する方法、特異的受容体を利用する方法、細胞融合法 (HVJ (センダイウイルス)、ポリエチレングリコール (PEG)、電気的細胞融合法、微少核融合法 (染色体移入)) が挙げられる。また、物理的方法としては、マイクロインジェクション法、エレクトロポレーション法、ジーンパーティクルガン (gene gun) を用いる方法が挙げられる。化学的方法としては、リン酸カルシウム沈殿法、リポソーム法、DEAE デキストラン法、プロトプラスト法、赤血球ゴースト法、赤血球膜ゴースト法、マイクロカプセル法が挙げられる。

本発明の検出方法においては、前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドを発現する細胞として、株化白血球細胞を用いることもできる。株化白血球細胞としては、Eol、YY-1、HL-60、TF-1、および AML14.3D10 など白血球由来の株化細胞を例示できる。白血球細胞株の中でも、好酸球に由来する細胞株は、本発明の検出方法に好適である。好酸球に由来する細胞株としては、例えば、Eol、YY-1、AML14.3D10 等を挙げることができる。

Eol (Eol-1: Saito H et al, Establishment and characterization of a new human eosinophilic leukemia cell line. Blood 66, 1233-1240, 1985) は、林原研究所より入手することができる。同様に YY-1 (Ogata N et al, The activation of the JAK2/STAT5 pathway is commonly involved in signaling through the human IL-5 receptor. Int. Arch. Allergy Immunol., Suppl 1, 24-27, 1997) は、サイトシグナル

研究所より分与される。また AML14. 3D10 (Baumann MA et al, The AML14 and AML14. 3D10 cell lines: a long-overdue model for the study of eosinophils and more. Stem Cells, 16, 16-24, 1998) は、米国オハイオ州、Research Service, VA Medical Center Dayton の Paul CC より、商業的に入手可能である。

5     その他、未分化白血球細胞株である HL-60 クローン 15 (ATCC CRL-1964) は、酪酸存在下で 1 週間程度培養すれば、好酸球に分化し好酸球細胞株とすることができる。好酸球であることは、形態的に、多形核で好酸球顆粒が認められることにより判別することができる。形態的な観察は、ギムザ染色やディフクイック染色によって行われる。一般に、好酸球を含むヒト白血球細胞株は、白血病の患者サンプルから不死化した細胞をクローニングすることにより樹立することができる。従って、当業者は、必要に応じて好酸球細胞株を公知の方法によって得ることもできる。このスクリーニング方法においては、まず前記株化白血球細胞に候補化合物を添加する。その後、該株化白血球細胞における前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定し、該遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物を選択する。

15     *in vitro* における検出方法のための細胞として、前記 (a) または (b) に記載したポリヌクレオチドの発現を調節した形質転換細胞を用いることができる。このような形質転換細胞としては、例えば当該ポリヌクレオチドのアンチセンス発現ベクターを形質転換した細胞を挙げることができる。アンチセンス発現ベクターによる形質転換細胞は、前記トランスジェニック動物の作成と同様の原理によって得ることができる。得られた形質転換細胞を用いて該遺伝子の発現レベルに与える候補化合物の影響を検出することもできる。

20     なお本発明の方法において、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルは、これらの遺伝子がコードするタンパク質の発現レベルのみならず、対応する mRNA を検出することにより比較することもできる。mRNA によって発現レベルの比較を行うには、タンパク質試料の調製工程に代えて、先に述べたような mRNA 試料の調製工程を実施する。mRNA やタンパク質の検出は、先に述べたような公知の方法によって実施することができる。

25     さらに NOR-1 遺伝子の転写調節領域を取得し、レポーターアッセイ系を構築することができる。レポーターアッセイ系とは、転写調節領域の下流にこの転写調節領域の制御下に発現するレポーター遺伝子の発現量を指標として、該転写調節領域に作用する転写調節因子をスクリーニングするアッセイ系をいう。

30     転写調節領域としては、プロモーター、エンハンサー、さらには、通常プロモーター領域に見られる CAAT ボックス、TATA ボックス等を例示することができる。またレポーター遺伝子として、CAT (chloramphenicol acetyltransferase) 遺伝子、ルシフェラーゼ (luciferase) 遺伝子、成長ホルモン遺伝子等を利用することができる。

35

NOR-1 遺伝子の転写調節領域は、当業者においては、一般的な方法、例えば、以下の方法により取得することができる。まず、配列番号：1に記載された塩基配列に基づいて、BAC ライブラリー、YAC ライブラリー等のヒトゲノム DNA ライブラリーから、PCR またはハイブリダイゼーションを用いる方法によりスクリーニングを行い、該 cDNA の配列を含むゲノム DNA クローンを得る。得られたゲノム DNA の配列を基に、NOR-1 遺伝子の転写調節領域を推定し、該転写調節領域を取得する。得られた転写調節領域を、レポーター遺伝子の上流に位置するようにクローニングしてレポーターコンストラクトを構築する。得られたレポーターコンストラクトを培養細胞株に導入してスクリーニング用の形質転換体とする。この形質転換体に候補化合物を接触させ、レポーター遺伝子の発現を検出することによって、転写調節領域に対する候補化合物の作用を評価することができる。

本発明の前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法に基づいて、前記ポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニングを行うことができる。本発明は、次の工程を含む前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを変化させる化合物のスクリーニング方法に関する。

すなわち本発明は、*in vivo* および/または *in vitro* において、候補化合物による前記ポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記 (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法を提供する。

あるいは本発明は、NOR-1 遺伝子の転写調節領域を利用するレポーターアッセイによる、転写調節領域に作用する化合物のスクリーニング方法に関する。本発明によるレポーターアッセイの結果に基づいて、対象と比較してレポーター遺伝子の発現を上昇させる化合物を選択することにより、NOR-1 遺伝子の発現を誘導する化合物を取得することができる。あるいは、リガンド結合領域に結合するアゴニストまたはアンタゴニストのスクリーニング方法に関する。

本発明者らによってアレルギー性疾患に関連するタンパク質として見出された NOR-1 (MINOR) 受容体タンパク質は、オーファン受容体であり生体内リガンド活性物質はこれまでのところ見つかっていない。NOR-1 タンパク質のリガンド活性物質は、好酸球細胞内でダイレクトに NOR-1 を活性化し、アポトーシスを促進させるものと考えられる。従って、NOR-1 受容体のリガンド活性物質はアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。通常、受容体タンパク質と結合し得る化合物の探索を行うことにより、該受容体のリガンドを取得することが可能である。

本発明は、NOR-1 タンパク質と結合し得る化合物を選択することを特徴とする、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法を提供する。本方法においては、NOR-1 受容体タンパク質と被験化合物を接触させ、次いで、NOR-1 受容

体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定し、NOR-1 受容体タンパク質と結合する化合物を選択する。また、単に結合をするのみでなく、NOR-1 の転写活性を測定し、アゴニスト、アンタゴニストを選択する。

- 5 本方法における NOR-1 受容体タンパク質には、その部分ペプチドも含まれる。上記方法における NOR-1 受容体タンパク質と被検化合物との結合活性の測定は、当業者においては公知の方法を利用して実施することができる。

- 例えば、NOR-1 と結合する化合物がタンパク質である場合には、本発明のスクリーニング方法は、ウェストウエスタンブロッティング法により行うことができる。具体的には、NOR-1 タンパク質と結合するタンパク質（被検タンパク質）を発現している  
10 ことが予想される組織または細胞よりファージベクター（ $\lambda$ gt11, ZAPII など）を用いた cDNA ライブラリーを作製し、これを LB-アガロース上で発現させフィルターに発現させたタンパク質を固定する。次いで、NOR-1 タンパク質をビオチンラベル化、あるいは GST タンパク質との融合タンパク質として精製し、これを上記フィルターと反応させ、被検タンパク質を発現しているブランクを、ストレプトアビジンや抗 GST  
15 抗体などにより検出を行うことにより、結合活性を評価することができる。

また、本発明のアレルギー性疾患治療薬のための候補化合物のスクリーニング方法の別の態様においては、下記の工程を含む。

- （１）NOR-1 受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節タンパク質との融合タンパク質を発現し得る DNA、および該転写調節タンパク質の結合  
20 する DNA 配列の下流にレポーター遺伝子が機能的に結合した構造を有する DNA、を導入した細胞を提供する工程

- （２）前記細胞と被検化合物を接触させる工程  
（３）前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程  
（４）前記活性を変化させる化合物を選択する工程

- 25 上記方法における「機能的に結合した」とは、NOR-1 受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域が、該受容体タンパク質のリガンドもしくはリガンド様化合物と結合した際に、レポーター遺伝子が発現し得るように結合した状態を指す。上記方法における「転写調節領域結合タンパク質」としては、通常、GAL4 タンパク質を好適に使用することができる。また、上記「転写調節領域結合タンパク質の結合  
30 し得る DNA 配列」としては、例えば、GAL4 結合 DNA 領域を挙げることができる。さらに本発明の上記スクリーニング方法は、ハイスループットで行うことが可能である。

- 上記スクリーニング方法の好ましい態様としては、「two ハイブリッドシステム」（例えば、「MATCHMARKER Two-Hybrid System」, 「Mammalian MATCHMAKER Two-Hybrid Assay Kit」, 「MATCHMAKER One-Hybrid System」(いずれも clontech 社製)、「Hyb  
35 riZAP Two-Hybrid Vector System」(stratagene 社製)、文献「Dalton S, and Treisman R (1992) Characterization of SAP-1, a protein recruited by serum response

factor to the c-fos serum response element. Cell 68, 597-612」) を用いてスクリーニングを行うことができる。本発明の上記方法は、より具体的には、以下のようにして実施することができるが、この方法に特に限定されず、当業者においては、以下に例示した方法を適宜改変して実施することが可能である。

- 5 two-ハイブリッドシステムにおいては、NOR-1 タンパク質またはその部分ペプチドを、通常、GAL4 DNA 結合領域と融合させて酵母細胞の中で発現させ、NOR-1 タンパク質またはその部分ペプチドと結合するタンパク質を発現していることが予想される細胞より、VP16 または GAL4 転写活性化領域と融合する形で発現するような cDNA ライブラリーを作製し、これを上記酵母細胞に導入し、検出された陽性クローンからライ
- 10 ブラリー由来 cDNA を単離する（酵母細胞内で NOR-1 タンパク質またはそのリガンド結合領域を含む部分ペプチドと結合するタンパク質が発現すると、両者の結合によりレポーター遺伝子が活性化され、陽性のクローンが確認できる）。単離した cDNA を大腸菌に導入して発現させることにより、該 cDNA がコードするタンパク質を得ることができる。これにより NOR-1 タンパク質またはその部分ペプチドに結合するタン
- 15 パク質またはその遺伝子を調製することが可能である。two ハイブリッドシステムにおいて用いられるレポーター遺伝子としては、例えば、HIS3 遺伝子の他、Ade2 遺伝子、LacZ 遺伝子、CAT 遺伝子、ルシフェラーゼ遺伝子、PAI-1 (Plasminogen activator inhibitor type1) 遺伝子等が挙げられるが、これらに制限されない。two ハイブリッド法によるスクリーニングは、酵母の他、哺乳動物細胞等を使って行うこともできる。
- 20 本発明者らは、哺乳動物細胞を用いた two ハイブリッドシステムを応用して、NOR-1 タンパク質の転写活性化機能を上昇させるリガンドをスクリーニングすることが可能なハイスループット系を構築した。この系は、従来の哺乳動物における two ハイブリッドシステムを改良したものであり、この系の概略を図 3 に示す（詳細は後述の実施例を参照）。
- 25 本発明のスクリーニング方法は、好ましくは、上記の本発明者らによって開発されたハイスループット系を用いて行うことができる。NOR-1 は、他のサブファミリー（ $\alpha$  と  $\beta$ ）とは異なり、転写活性にリガンド結合領域だけでなく、N 末近傍の AF1 領域（図 4）が重要であることが、本発明者らによって示唆された。従って、上記の方法における、GAL4 と融合タンパク質を形成させる NOR-1 タンパク質は、リガンド
- 30 結合領域だけではなく、全長タンパク質であることが好ましい。
- NOR-1 は、アトピー性皮膚炎末梢血のような白血球が機能亢進した状態で発現誘導され、その結果として細胞にアポトーシスが誘導される可能性が高い。生体内に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで本発明者らは、このような条件で産生されると予想される低分子の脂溶性メディエーターをリガンド候補被検化合物として、上記の方法によりスクリーニングを行った。
- 35 そして本発明者らは、脂溶性メディエーターの中から、リガンド活性物質として、プ

ロスタグランジン  $A_2$  (prostaglandin  $A_2$ )、プロスタグランジン  $A_1$  (prostaglandin  $A_1$ )、16,16-ジメチル プロスタグランジン  $A_2$  (16,16-dimethyl prostaglandin  $A_2$ )、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$  (15(R)-15-methyl prostaglandin  $A_2$ )、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン  $A_2$  (16-phenoxy tetranor prostaglandin  $A_2$ )、17-フェニル トリノール プロスタグランジン  $A_2$  (17-phenyl trinor prostaglandin  $A_2$ )、15-デオキシ-デルタ 12,14-プロスタグランジン  $J_2$  (15 deoxy-delta12,14-prostaglandin  $J_2$ )、8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  (8-iso prostaglandin  $A_1$ )等  
5 を取得することに成功した。これらの化合物は、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである。このことは、本発明の方法によって NOR-1 (MINOR) の転写活性化機能をアップレギュレートするリガンド活性物質を実際に取得することが可能であることを示すものである。

NOR-1 タンパク質と結合する化合物のスクリーニングは、アフィニティークロマトグラフィーを用いて行うこともできる。例えば、NOR-1 タンパク質をアフィニティークラムの担体に固定し、ここに NOR-1 タンパク質と結合するタンパク質を発現していることが予想される被検試料を適用する。この場合の被検試料としては、例えば細胞  
15 抽出物、細胞溶解物等が挙げられる。被検試料を適用した後、カラムを洗浄し、NOR-1 タンパク質と結合したタンパク質を調製することができる。

取得したタンパク質は、例えば、該タンパク質のアミノ酸配列を分析し、それを基にオリゴ DNA を合成し、該 DNA をプローブとして cDNA ライブラリーをスクリーニングすることにより、該タンパク質をコードする DNA を得ることができる。

本発明において、結合した化合物を検出又は測定する手段として表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーを使用することもできる。表面プラズモン共鳴現象を利用したバイオセンサーは、NOR-1 タンパク質と被検化合物との間の相互作用を、表面プラズモン共鳴シグナルとしてリアルタイムに観察することが可能である（例えば BIAcore、Pharmacia 製）。従って、BIAcore 等のバイオセンサーを用いることにより NOR-1 タンパク質と被検化合物との結合を評価することが可能である。

NOR-1 タンパク質と結合する化合物を単離することは、当業者においては通常行い得ることである。上記以外の方法として、例えば、固定した NOR-1 タンパク質に、合成化合物、天然物バンク、もしくはランダムファージペプチドディスプレイライブラリーを作用させ、本発明のタンパク質に結合する分子をスクリーニングする方法等を示すことができる。

本発明による、候補化合物の NOR-1 遺伝子の発現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出する方法に用いられる細胞、並びに該遺伝子の発現レベルを調べるためのポリヌクレオチド、あるいは抗体を組み合わせ、この方法のための検出用キットと  
35 することができる。キットには、陽性対照や陰性対照として用いられる候補化合物や指示書を組み合わせることもできる。本発明に基づく候補化合物の NOR-1 遺伝子の発

現レベルや転写活性化機構に与える影響を検出するためのキットは、例えば、NOR-1 遺伝子の発現レベルや転写活性化機構を修飾する化合物のスクリーニング用キットとして利用することができる。

- 5 本発明のスクリーニング方法に用いる被検候補化合物としては、特に制限されないが、例えば、ステロイド誘導体等既存の化学的方法により合成された化合物標品、コンビナトリアルケミストリーにより合成された化合物標品、動・植物組織の抽出物もしくは微生物培養物等の複数の化合物を含む混合物、精製タンパク質、遺伝子ライブラリーの発現産物、合成ペプチドのライブラリー等が挙げられる。また、本発明の NOR-1 タンパク質と結合する化合物のスクリーニング方法においては、特に制限され
- 10 ないが、低分子の脂溶性メディエーターを被検候補化合物とすることが好ましい。

- 本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、アレルギー性疾患の治療薬として有用である。NOR-1 遺伝子は、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加する。従って、この遺伝子の発現あるいは機能を増強することができる化合物には、アトピー性皮膚炎の症状を抑える作用が期待できる。
- 15 また、本発明のスクリーニング方法によって選択される化合物は、NOR-1 活性化とそれに伴う好酸球アポトーシス誘導という全く新しい作用機序を有するアレルギー性疾患治療薬となるものと期待される。従って本発明は、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を提供する。なお上記化合物には、本発明のスクリーニング方法を用いて単離し
- 20 る化合物の構造の一部を、付加、欠失及び／又は置換により変換される化合物も含まれる。上述のように、脂溶性メディエーターの中から、NOR-1 の転写活性化能を増強する化合物 (NOR-1 のリガンド活性物質) として本発明者らにより、シクロペンテン構造を有するプロスタグランジンが見出された。従って、本発明のアレルギー性疾患治療薬として、例えば、本発明のスクリーニング方法によって得ることができるシ
- 25 クロペンテン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を好適に挙げるることができる。該プロスタグランジンの具体例としては、プロスタグランジン  $A_2$  (prostaglandin  $A_2$ )、プロスタグランジン  $A_1$  (prostaglandin  $A_1$ )、16, 16-ジメチル プロスタグランジン  $A_2$  (16, 16-dimethyl prostaglandin  $A_2$ )、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$  (15(R)-15-methyl prostaglandin  $A_2$ )、
- 30 16-フェノキシ テトラノル プロスタグランジン  $A_2$  (16-phenoxy tetranor prostaglandin  $A_2$ )、17-フェニル トリノル プロスタグランジン  $A_2$  (17-phenyl trinor prostaglandin  $A_2$ )、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $J_2$  (15 deoxy-delta 12, 14-prostaglandin  $J_2$ )、8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  (8-iso prostaglandin  $A_1$ )等を挙げることができる。

- 35 また本発明の NOR-1 受容体のリガンド活性を有する物質は、好酸球のアポトーシスを誘導し、抗アレルギー作用を有するものと考えられる。従って、本発明は、NOR-1

受容体のリガンドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤、並びに、NOR-1 受容体のリガンドを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬を提供する。本発明のアポトーシス誘導剤は、好ましくは、好酸球のアポトーシス誘導剤である。

NOR-1 受容体のリガンドとしては、上記のシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジン、後述の表 1 4 ~ 5 8 に掲載の化合物等を挙げることができる。その他、NOR-1 の転写に影響を与える化合物として例えば、文献『Abayratna Wansa KS, Harris JM, Yan G, Ordentlich P, Muscat GE, The AF-1 domain of NOR-1/NR4A3 mediates trans-activation, coactivator recruitment, and activation by the purine anti-metabolite 6-Mercaptopurine; J Biol Chem. 2003 Apr 22 [E-publication ahead of print]』に記載の化合物を挙げることができる。

また、NOR-1 (MINOR) の合成リガンドは、当業者においては NOR-1 の立体構造とのドッキングスタディーから容易に推察され合成展開することが可能である。

「ドッキングスタディー」とは通常、受容体の立体構造に基づいた 3 D クエリーファーマコファーマモデルにより、数 10 万個の化合物の 3 次元 DB の中から、リガンド結合ドメインにフィットする化合物やコンフォーメーションをコンピュータ上で探索することを言う。ドッキングスタディーは、例えば、以下の (1) ~ (4) の手順に従って行われる。

(1) Modeler によるタンパクの 3 D 構造の構築 (ホモロジーモデル)

(2) C 2 . LigandFit による結合部位の検索

(3) C 2 ・ S B F による結合部位の Pharmacophore クエリ構築

(4) Pharmacophore クエリによる 3 D データベースの検索

3 D Pharamocophore 検索に関する文献としては、例えば、Pharmacophore Perception, Development, and Use in Drug Design (Iul Biotechnology Series, 2)-US-I SBN:0963681761 (Hardcover) Guner, Osman F. (Edt) /Publisher: Intl Univ Line P ublished 1999/12 等を挙げることができる。

このような合成リガンドを有効成分として含有する薬剤もまた、本発明のアレルギー性疾患治療薬に含まれる。また、上記合成リガンドは被検候補化合物として、本発明の上記方法に供することにより、真のリガンドであるか否かを評価することも可能である。

また本発明者らは、本発明の NOR-1 受容体の発現が好酸球内で特異的に誘導されることを初めて見出したことから、該受容体の低分子リガンドの探索を行った。より詳しくは、ファーマコフォアモデルにより、PGA 誘導体の NOR-1 リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートし、PGA 誘導体のレポーター系における構造活性相関情報から、結合ポケットに適合する PGA 誘導体以外の化合物をデータベースより選択した。従って、本発明の NOR-1 受容体のリガンドとして、上記のようにして選択された化合物を挙げることができる。より具体的には表 1 4 ~ 5 8 に掲載の化合物を示すこ



とができる。これらの化合物は、本発明の受容体に対するアゴニスト抗体よりも、有用であるものと考えられる。

また本発明者らは、好酸球 CD30 リガンド刺激によって、NOR-1 遺伝子の発現を上昇させることを見出した。本発明は、好酸球 CD30 受容体のリガンドを含む、NOR-1 5 遺伝子の発現誘導剤を提供する。該発現誘導剤は、好酸球における Nor1 の下流遺伝子の発現を制御することによって好酸球のアポトーシスを誘導することを機序とする、アレルギー性疾患治療薬となることが期待される。

本発明のアレルギー性疾患治療薬は、生理学的に許容される担体、賦形剤、あるいは希釈剤等と混合することによって製造することも可能である。本発明のアレルギー 10 性疾患の治療剤は、アレルギー症状の改善を目的として、経口、あるいは非経口的に投与することができる。

経口剤としては、顆粒剤、散剤、錠剤、カプセル剤、溶剤、乳剤、あるいは懸濁剤等の剤型を選択することができる。非経口剤としては、例えば、注射剤、座薬、塗り 15 薬等を挙げることができる。注射剤としては、皮下注射剤、筋肉注射剤、あるいは腹腔内注射剤等を示すことができる。

投与量は、患者の年齢、性別、体重および症状、治療効果、投与方法、処理時間、あるいは該医薬組成物に含有される活性成分の種類などにより異なるが、通常成人一人あたり、一回につき 0.1 mg から 500 mg の範囲で、好ましくは 0.5 mg から 20 mg の範囲で投与することができる。しかし、投与量は種々の条件により変動するため、 20 上記投与量よりも少ない量で十分な場合もあり、また上記の範囲を超える投与量が必要な場合もある。

また本発明者らは、NOR-1 受容体タンパク質の発現が亢進することにより、細胞がアポトーシス誘導することを見出した。従って、細胞において NOR-1 タンパク質を活性化させることにより、アポトーシスを誘導させることが可能である。従って本発明 25 は、細胞における NOR-1 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法を提供する。上記方法には、NOR-1 遺伝子の発現を活性化させることにより、細胞のアポトーシス誘導を行う方法も含まれる。

本方法の好ましい態様においては、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテン構造を有するプロスタグランジンと細胞とを 30 接触させることにより、アポトーシスの誘導を行う。本発明の上記方法における細胞は、好酸球細胞であることが好ましい。アトピー性皮膚炎の治療における寛解期において末梢血好酸球数が減少することが知られている。よって、本発明の方法を利用して好酸球を特異的に細胞死に導くことにより、アレルギー性疾患を治療することが可能と考えられる。即ち、本方法は、アレルギー性疾患の治療方法として有用である。

35 また、本発明のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテン構造を有するプロスタグランジンは、アポトーシスを誘導する作用がある

ものと考えられることから、本発明は、これら化合物を含有するアポトーシス誘導剤も提供する。

本発明により、アトピー性皮膚炎患者の増悪期と寛解期とで好酸球において発現に差の見られる遺伝子が提供された。本発明の遺伝子の発現を指標にすることにより、アレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングを行うことが可能となった。

本発明におけるアレルギー性疾患関連遺伝子は、アレルゲンの種類にかかわらず、簡便にその発現レベルを知ることができる。従って、アレルギー反応の病態を総合的に把握することができる。

また本発明のアレルギー性疾患の検査方法は、末梢血好酸球を試料としてその発現レベルを解析することができるので、患者に対する侵襲性が低い。遺伝子解析技術は、年々ハイスループット化、低価格化が進行している。従って本発明によるアレルギー性疾患の検査方法は、近い将来、ベッドサイドにおける重要な診断方法となることが期待される。この意味で本発明の方法の診断的価値は高い。

更に、本発明のスクリーニング方法は、アトピー性皮膚炎の代表的な臨床マーカーである好酸球の増減と密接に関連する遺伝子機能を指標として実施される。従って、このスクリーニング方法によって見出すことができる化合物は、幅広いアレルギーの病態制御に有用であると期待できる。

また本発明により提供されるアレルギー性疾患治療薬は、NOR-1の活性化とそれに伴う好酸球のアポトーシス誘導という全く新しい作用機序をもった医薬品として有用である。

以下、本発明を実施例により、さらに具体的に説明するが本発明はこれら実施例に制限されるものではない。

#### EXAMPLE 1

##### ディファレンシャルディスプレイ解析

アトピー性皮膚炎の同一患者における増悪期と、薬物治療その他による寛解期の末梢血より単離した血球細胞を比較して、発現変動している新しい治療関連遺伝子あるいは診断に有用な遺伝子を見出すことを目的としてスクリーニングを行った。

##### (1) 被検者

血液を採取した7例のアトピー性皮膚炎患者のプロフィールを表2に示す。アレルゲン非特異的 (Total IgE)、ダニおよびスギ特異的 IgE はEIA法により測定した。すなわち、抗ヒトIgE抗体を結合させたキャップに被検血清を反応させ、血清中のアレルゲン非特異的IgE抗体、またはダニ、スギ特異的IgE抗体を結合させた。次に、 $\beta$ -D-ガラクトシダーゼ標識抗ヒトIgE抗体と基質液 (4-メチルウンベルフェリル

$\beta$ -D-ガラクトピラノシド)を加え、反応させて蛍光物質を生成させた。反応停止液を加えて反応を停止させ、同時測定標準 IgE の蛍光強度より抗体濃度を決定した。LDH の測定は、UV 法 (Wroblewski-La Due 法) により、ピルビン酸と NADH の反応による NADH の減少速度を吸光度の減少から算出した。LDH 値の測定には、L タイプワコー LDH (和光純薬) と 7170 型自動分析装置 (日立) を用いた。好酸球数は、EDTA 添加血液 2ml を試料として鏡検法と自動血球分析装置 SE-9000 (RF/DC インピーダンス方式、Sysmex 製造) により測定した。

5

表 2

患者番号	1	2	3	4	5	6	7
Donor ID	PA00002	PA00068	PA00069	PA00070	PA00071	PA00073	PA00164
病態	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期	増悪期 寛解期
T-IgE	6100 7100	2600 2100	13000 20000	15000 15000	9300 9200	17000 8800	2100 1600
ダニ	82.1 73.8	66.4 >100	72.2 66.7	85.9 90.9	74.6 70.8	88 >100	>100 82.8
スギ	57.1 77.2	14.4 19.7	15.2 22.5	61.9 59.6	64.2 71.1	18.3 9.27	6.51 3.61
LDH	910 475	293 296	398 250	173 182	534 297	620 598	343 393
好酸球(%)	16 11.7	23.2 10.1	16 6.2	8.6 12.1	28.2 13.4	13.4 12.3	12.9 10.6
好酸球 (/mm <sup>3</sup> )	1620 611	1420 468	2070 527	738 752	1830 972	945 846	898 847
内服	アルデシン吸、テオドール インターナル吸、ザジデン	ザジデン		ザジデン、消風散 アタラックスP	セルテクト インターナル経口	ザジデンDS、 インターナル無し	プレドニン(181 のみ) テオロング。ア ルデシン
外用	身体：ザルック ス 顔： ロコイド	身体：ロコイド 顔：非ステロイド	身体：ザルック ス 顔：非ステロイド	身体：ロコイド 顔：非ステロイド	身体：ロコイド 顔：非ステロイド	身体：ザルック ス デロンV 顔：ロコイド	身体：ザルック ス 顔：ロコイド
他の疾病	喘息(中等症)				喘息(中等症)		喘息(重/軽症)

(2) ディファレンシャルディスプレイ解析

患者から採取した全血に3%デキストラン溶液を加えて30分室温放置し、赤血球を沈降させた。上層の白血球画分を回収し、フィコール溶液 (Ficoll-Paque PLUS; アマシャムファルマシアバイオテック) の上に載せて1500rpm、30分室温で遠心した。下層に回収された顆粒球画分をCD16抗体磁気ビーズと4°Cで30分反応させ、MACSを用いた分離でトラップさせずに溶出する細胞を好酸球として実験に用いた。

上記のように調製した好酸球をIsogen (日本ジーン; 和光純薬) に溶解し、この溶液から、Isogenに添付されているプロトコルに従ってRNAを分離した。クロロホルムを加え、攪拌遠心して水層を回収した。次にイソプロパノールを加え、攪拌遠心して沈殿の全RNAを回収した。回収した全RNAは、DNase (日本ジーン; 和光純薬) を加えて37°C15分反応させ、フェノール-クロロホルム抽出してエタノール沈殿でRNAを回収した。

このように調製した全RNAを用いて蛍光ディファレンシャルディスプレイ (Fluorescent Differential Display, 「DD」と略記する) 解析を行った。DD解析は文献 (T. Itoら, 1994, FEBS Lett. 351: 231-236) に記載の方法に準じて行った。まず全RNAを逆転写し、cDNAを得た。第一次DD-PCR反応用には3種のアンカープライマーの各々について全RNAの各0.2μgを用いてcDNAを調製した。第二次DD-PCR反応用には、3種のアンカープライマーの各々についてRNA 0.4μgを用いてcDNAを調製した。いずれのcDNAも、0.4ng/μl RNA相当の最終濃度に希釈し、実験に用いた。1反応あたり1ng RNA相当のcDNAを用いてDD-PCR反応を行った。反応液の組成は表3の通りである。

表 3

cDNA (0.4ng/μl RNA 相当)	2.5μl
任意プライマー (2μM)	2.5μl
10×AmpliTaq PCR バッファー	1.0μl
2.5mM dNTP	0.8μl
50μM アンカープライマー (GT15A, GT15C, GT15G)	0.1μl
Gene Taq (5U/μl)	0.05μl
AmpliTaq (5U/μl)	0.05μl
dH <sub>2</sub> O	3.0μl
総量	10.0μl

PCRの反応条件は、「95°C3分、40°C5分、72°C5分」を1サイクル、続いて、「94°C15秒、40°C2分、72°C1分」を30サイクルの後、72°C5分、その後連続的に4°Cにした。

使用したプライマー対はアンカープライマーである GT15A (配列番号 : 3) 、GT15C (配列番号 : 4) 、および GT15G (配列番号 : 5) に対して任意プライマーをそれぞれ AG 1~110、AG 111~199、および AG 200~287 を組み合わせ、計 287 組の反応をおこなった。なお、任意プライマーとしては GC 含量 50% の 10 ヌクレオチドからなるオリゴマーを設計し、合成して用いた。

ゲル電気泳動は、6%変性ポリアクリルアミドゲルを作製し、2.5 $\mu$ l の試料をアプラインし、40W で 210 分間泳動した。その後、日立製蛍光イメージアナライザー FMBIO II を用いてゲル板をスキャンし、蛍光検出によって泳動画像を得た。

- 増悪期及び寛解期の両サンプルを並べて泳動し、ほとんどの患者で同方向に発現が変動している遺伝子バンドを目で判定し、切り取って TA クローニングおよび配列決定を行った。その結果、増悪期に比べ寛解期に有意に発現の亢進する DNA 配列 (DD 解析のバンド ID 2250-01; 以後、この配列を「2250-01」と称す) を見出した。バンド ID 2250-01 の増幅に用いたプライマーセットを以下に示す。

バンド ID : 2250-01

- 断片の長さ : 421 bp (プライマーの配列を除く)  
アンカープライマー : GT15C  
任意プライマーの名前 : AG00164  
任意プライマーの配列 : CATTCTCAGG (配列番号 : 6)

## 20 (3) 発現解析

2250-01 の発現量を定量的に確認するために、同一臨床サンプルを用いてさらに ABI I 7700 による定量的 PCR を行った。ABI 7700 による測定に用いたプライマーおよび TaqMan プローブは、ディファレンシャルディスプレイ法によって得られた配列情報から Primer Express (PE バイオシステムズ) により設計した。TaqMan プローブの 5' 末端は FAM (6-carboxy-fluorescein) で、また 3' 末端は TAMRA (6-carboxy-N, N, N', N'-tetramethylrhodamine) で標識されている

- ・ 2250-01 フォワードプライマー  
TGCCTTGTCTAGAACTGCACAG (配列番号 : 7)  
・ 2250-01 リバースプライマー  
AAGTGTGTTGGACCAAGCAGC (配列番号 : 8)  
・ 2250-01 TaqMan プローブ  
AAGTCAGTGCAGAGCCTGGATGAGGA (配列番号 : 9)

- 鋳型には全 RNA からポリ T (12~18mer) をプライマーとして逆転写した cDNA を用いた。コピー数を算出する標準曲線のために両プライマーで増幅される塩基配列領域を含むプラスミドクローンを各々の遺伝子について準備し、その段階希釈を鋳型として反応を行った。PCR 増幅のモニタリングのための反応液の組成は表 4 に示した。

表 4

ABI-PRISM 7700 の反応組成 (1 ウェルあたりの反応量)

滅菌蒸留水	25.66 ( $\mu$ L)
10x TaqMan バッファーA	5
25mM MgCl <sub>2</sub>	7
dATP (10mM)	1.2
dCTP (10mM)	1.2
dGTP (10mM)	1.2
dUTP (10mM)	1.2
Forward Primer (100 $\mu$ M)	0.15
Reverse Primer (100 $\mu$ M)	0.15
TaqMan プローブ (6.7 $\mu$ M)	1.49
AmpliTaq Gold (5U/ $\mu$ L)	0.25
AmpErase UNG (1U/ $\mu$ L)	0.5
テンプレート溶液	5
総量	50

- 5 また、試料中の cDNA 濃度の差を補正するため、補正用内部標準として  $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)遺伝子について同様の定量解析を行い、それら遺伝子のコピー数を基に補正して、目的遺伝子のコピー数を算出した。 $\beta$ -アクチン( $\beta$ -actin)遺伝子の定量には、ヒト cDNA を鋳型として用いた。

- 10  $\beta$  アクチン測定用のプライマーとプローブは、TaqMan  $\beta$ -actin Control Reagents (PE バイオシステムズ) に添付のものを用いて行った。塩基配列は以下の通りである。 $\beta$  アクチンにより補正した「2250-01」発現量 (copy/ng RNA) を表 5 および図 1 に示す。

・  $\beta$  アクチンフォワードプライマー

TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A (配列番号: 10)

- 15 ・  $\beta$  アクチンリバースプライマー

CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G (配列番号: 11)

・  $\beta$  アクチン TaqMan プローブ

5'-(FAM)ATGCCC-T(TAMRA)-CCCCCATGCCATCCTGCGTp-3' (配列番号: 12)

FAM:6-carboxy-fluorescein

- 20 TAMRA:6-carboxy-N,N,N',N'-tetramethylrhodamine

表 5

2250-01 発現量 (copy/ng RNA)

患者番号	増悪期	寛解期
------	-----	-----

1	454.19	5298.42
2	137.06	167.13
3	53.86	4543.94
4	1577.46	642.43
5	403.84	4655.96
6	3745.25	801.14
7	173.98	286.83

#### (4) 統計解析

上記のデータを利用して、パラメトリック多重比較検定、およびノンパラメトリック多重比較検定を行った。上記のアトピー性皮膚炎患者7例の内4例（患者番号1, 2, 3, 5）については、治療による寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少する。血中好酸球数は、アトピー性皮膚炎の有用な臨床指標となっている。そこで、寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少する患者試料（患者番号1, 2, 3, 5）

(n=4) 4例のみについても統計的に解析した。統計解析は、The SAS SYSTEM の SAS 前臨床パッケージ Version 4.0 (SAS Institute Inc.) を用いて行った。結果を表6に示す。

表6  
2250-01 発現量 (copy/ng RNA)

対応のある2群の検定		好酸球減少群(n=4)に ついての対応のある2群 のt検定
t検定	Wilcoxon検定	
パラメトリック	ノンパラメトリック	
E<R p=0.274	E<R p=0.2969	E<R p=0.0572

その結果、上記のアトピー性皮膚炎患者7例中3例の患者（患者番号1, 3, 5）において、2250-01の発現の著しい上昇が観察された。この3例の患者は、治療による寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少する4例（表2参照）の患者に含まれていた。血中好酸球数は、アトピー性皮膚炎の有用な臨床指標となっている。そこで、寛解期への移行に伴って好酸球数が顕著に減少するこれら4例の患者試料（患者番号1, 2, 3, 5）(n=4)の2250-01の発現量の変化を統計的に解析した。統計解析は、The SAS SYSTEM の SAS 前臨床パッケージ Version 4.0 (SAS Institute Inc.) を用いて行った。

その結果、増悪期に比べ寛解期で有意に発現が上昇することが確認された(p=0.0572)。逆に好酸球の減少が見られない患者には、発現の著しい低下が見られた（患者番号4, 6）。以上の知見は、2250-01がアトピー性皮膚炎の寛解期における好酸球の減少に伴って、発現が上昇することを示している。



EXAMPLE 2

各種血液細胞での 2250-01 の発現

5 人の健常人の末梢血から分離した細胞での 2250-01 の発現を調べた。好酸球

- 5 (E) の分離は上記の通り行った。好中球 (N) は好酸球を溶出させた後、CD16 抗体磁気ビーズでトラップされた細胞を磁界から外して溶出、回収して調製した。一方、フィコール遠心分離で中間層に回収される単球画分を、MACS CD3 抗体磁気ビーズにより溶出画分 (M: monocyte と B cell の混合物) とトラップされる画分 (T cell 画分) に分離した。次に、溶出画分を MACS CD14 抗体磁気ビーズにより、溶出画分 (B cell 画分) とトラップされる画分 (monocyte 画分) に分け、それぞれを精製 T 細胞、精製 B 細胞、そして精製単球とした。
- 10

好酸球は Isogen、好中球、T 細胞、B 細胞、そして単球は RNeasy (Qiagen) を用いて可溶化し、全 RNA 抽出、DNase 処理後 (方法は前述の通り) 遺伝子発現解析に供した。用いたプライマー、プローブ等は上記と同一である。これらの血球細胞での平均発現量 (AVERAGE: copy/ng (補正值)) は以下の通りであった。

15

好酸球 (E) : 960

好中球 (N) : 73

好塩基球 (B) : 36

T 細胞 (T) : 11

- 20 単球 (M) : 103

この結果は、2250-01 が好酸球特異的に発現していることを示している。

EXAMPLE 3

塩基配列の伸長

- 25 実施例 1 で決定した塩基配列に基づいて、5' RACE 法により 2250-01 の塩基配列解析を進めた。さらに、SMART cDNA Library Construction kit (CLONTECH) により末梢血好酸球 RNA から作製したファージ cDNA ライブラリーを用いて、プラークハイブリダイゼーションによるクローニングを行った。2250-01 の配列内に設計したプライマー 2250-01F 及び 2250-01R を用いて 2250-01 の配列を含むプラスミドを鋳型に増幅
- 30 後、精製した 259bp の PCR 産物をプローブとして用いた。その結果 2250-01 の配列を含む約 2kb のインサートを持つクローンが得られた。決定した塩基配列 2087bp を配列番号 : 15 に示す。ゲノムデータベース解析の結果、この配列は NOR-1 (MINOR) と呼ばれる核内オーファン受容体のイントロン部分であることが分かった。

・プライマー配列

- 35 2250-01F : GTTCCAGGCAATAACATCATACC (配列番号 : 13)

2250-01R : GCTACTTGTGAACTCCCAAATG (配列番号 : 14)

EXAMPLE 4

NOR-1 遺伝子の発現解析

NOR-1 (MINOR) の報告されているエクソン配列について 7700 による発現測定を行った。TaqMan 法に使用したプライマーおよびプローブは次の通りである。

Primer1(5') : TGGGTGCCCTGGTAGAACT (配列番号 : 16)

Primer2(3') : GCTTCAGGTAGAAGATGCGCT (配列番号 : 17)

TaqMan probe : AGGAAGATCTGCACCCTGGGCCTC (配列番号 : 18)

その結果、イントロン部分で測定したときの結果と同様に、好酸球減少のみられた著効例の寛解期に誘導されるという傾向は再現した (図 2)。

アトピー性皮膚炎の、治療による寛解期に末梢血好酸球でこのようなアポトーティックな性格が示唆されるような遺伝子が亢進しているのは、末梢血好酸球数の減少とよく対応しており、この遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いと考えられる。

EXAMPLE 5

NOR-1 受容体リガンドの探索

好酸球を特異的に細胞死に導く経路を、NOR-1 (MINOR) の機能の増強を通じて促進することは、喘息のみでなく、本発明者らが調べたアトピー性皮膚炎も含めた種々のアレルギー性疾患の治療に繋がる可能性が高い。NOR-1 (MINOR) は構造上核内受容体であるが、オーファン受容体であり生体内リガンドや活性化物質はまだわかっていない。もしもそれらが見出されれば、好酸球細胞内でダイレクトに NOR-1 (MINOR) を活性化しアポトーシスを促進させることができる。従って、リガンド活性物質は抗アレルギー薬としての可能性が高いと考え、リガンドスクリーニングのためのハイスループット系を構築した。

Mammalian Two Hybrid のシステムを若干改変し、図 3 のように、pBIND の中に NOR-1 (MINOR) のリガンド結合領域配列または全長遺伝子 (図 4) を挿入し、NOR-1 と GAL4 の DNA 結合領域が in frame で融合したタンパク質が発現されるようにした。NOR-1 (MINOR) の場合は、他のサブファミリー ( $\alpha$  と  $\beta$ ) と異なり、転写活性に N 末に近い A F 1 領域が重要であることが推察され、Mammalian Hybrid システムにおいてもリガンド結合領域だけでなく全長遺伝子を挿入することが必要であることが分かった。実際、リガンド結合領域のみを組み込んだスクリーニング系では、哺乳類のメタボリックマップ上に存在する、生体内リガンドの可能性のあるどのような脂溶性代謝物にも活性が見出されなかった。NOR-1 (MINOR) の全長遺伝子を pBIND に挿入したプラスミドと GAL4 結合サイトをもったルシフェラーゼレポータープラスミドを NIH3T3 細胞に

コトランスフェクションし、ルシフェラーゼ活性を自動測定した。この系にさらに低分子物質を加えて、転写増強活性でスクリーニングを行うことができる。

NOR-1 (MINOR) は、アトピー性皮膚炎末梢血のような白血球が機能亢進した状態で発現誘導され、その結果として細胞にアポトーシスが誘導される可能性が高い。生体内

- 5 に存在するリガンドは、核内受容体が高発現している場所に存在する可能性がある。そこで、このような条件で産生されると予想される低分子の脂溶性メディエーターをリガンド候補としてアッセイ系に加え、ルシフェラーゼ活性の増強作用で評価した。脂溶性メディエーターの中から、prostaglandin A<sub>2</sub>、prostaglandin A<sub>1</sub>、15(R)-15-methyl prostaglandin A<sub>2</sub>、16-phenoxo tetranor prostaglandin A<sub>2</sub>、17-phenyl trin
- 10 or prostaglandin A<sub>2</sub> 等のシクロペンテノン構造をもったプロスタグランジンに、NOR-1 (MINOR) の転写活性化能を増強させる作用があることを見出した (図 5、表 7 ~ 13)。このように本発明者らの確立した方法によって、ハイスループットで NOR-1 (MINOR) の生体内リガンド及び合成リガンドを発見する道が開かれたとともに、prostaglandin A<sub>2</sub>、prostaglandin A<sub>1</sub> 等の化合物およびその近辺の代謝物が、NOR-1 (MINOR)
- 15 の真の生体内リガンドとしての可能性が高いことが明らかになった。

表 7

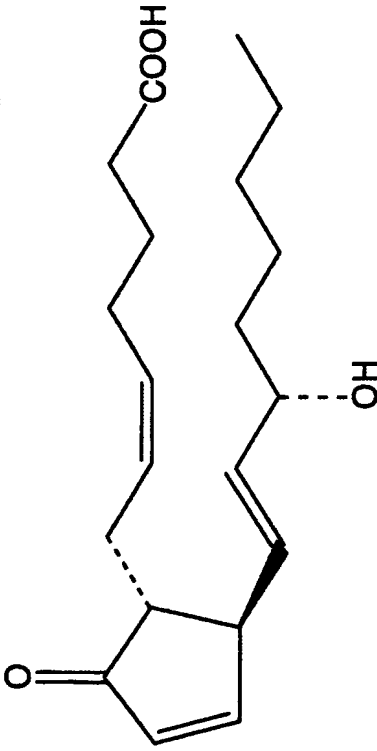
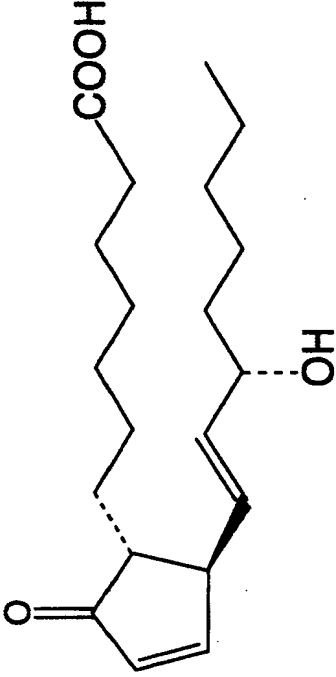
化合物名	構造式	Nor1 LBD-リガンド 活性		Nor1 全長-リガンド 活性	
		RXR(+)	RXR(-)	RXR(+)	RXR(-)
Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	○ 10 μM	○ 10 μM
Prostaglandin A <sub>1</sub>		x	x	○ 10 μM	○ 10 μM

表 8

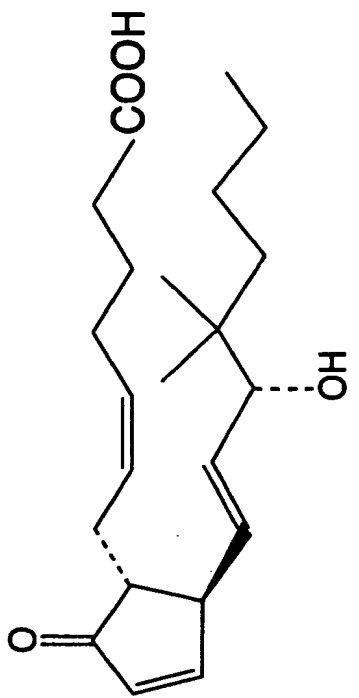
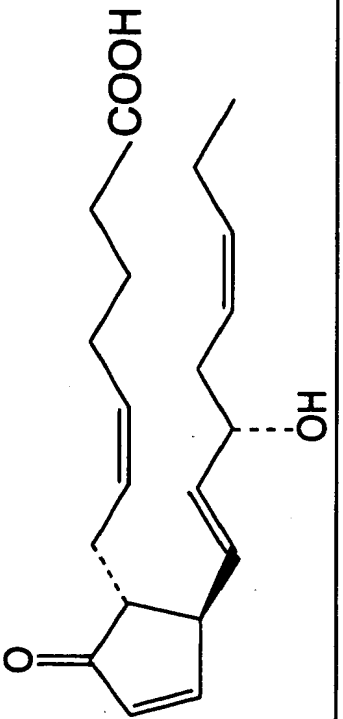
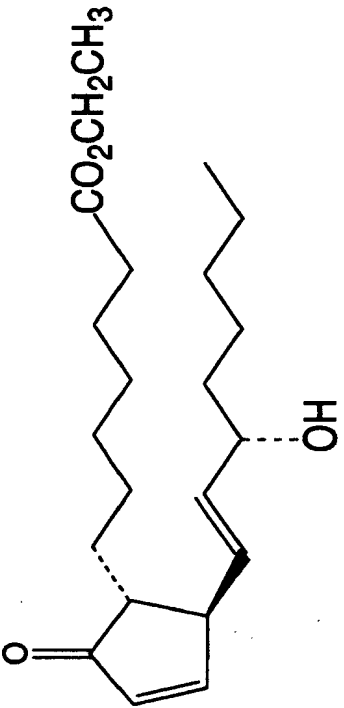
16,16-dimethyl Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	O 5 μM
Prostaglandin A <sub>3</sub>		x	x	O 5 μM
Prostaglandin A <sub>1</sub> ethyl ester		x	x	x

表 9

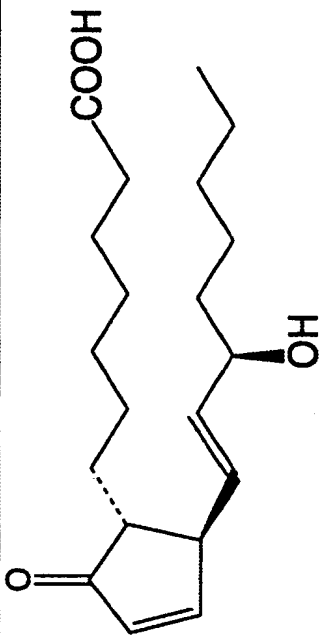
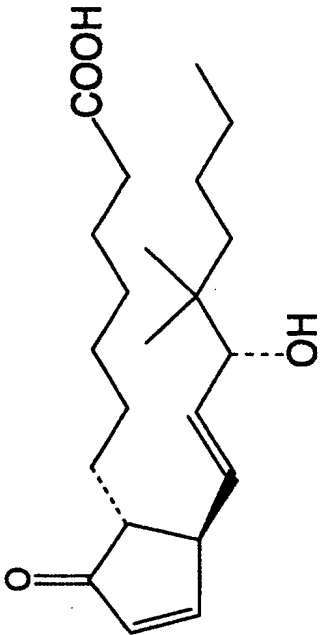
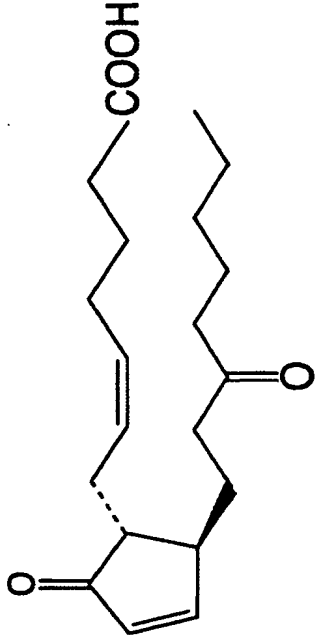
15-epi Prostaglandin A <sub>1</sub>		x	x	x
16,16-dimethyl Prostaglandin A <sub>1</sub>		x	x	x
13,14-dihydro-15- keto Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	x

表 10

15(R)-15-methyl Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	x	○ 10 μM
15-deoxy-Δ <sup>12,14</sup> - Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	x	○ 10 μM
16-phenoxy tetranor Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	x	○ 30 μM

表 1 1

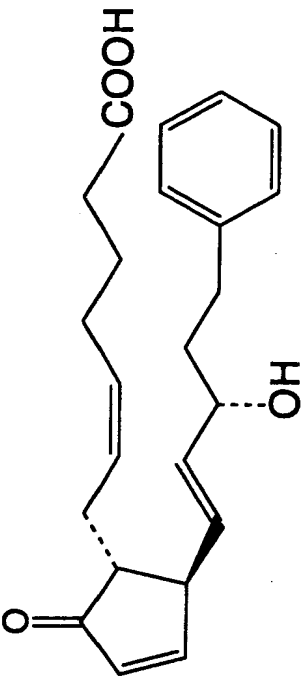
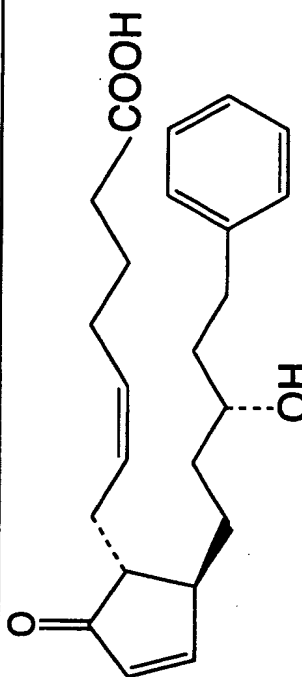
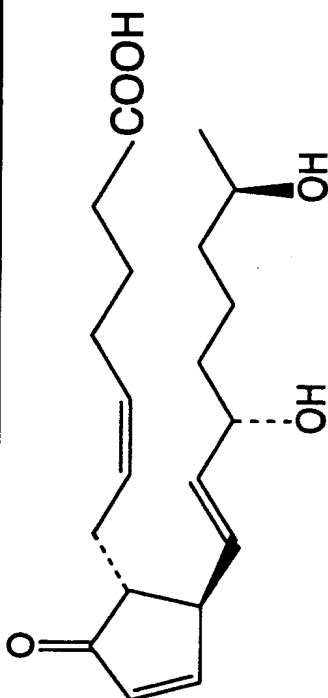
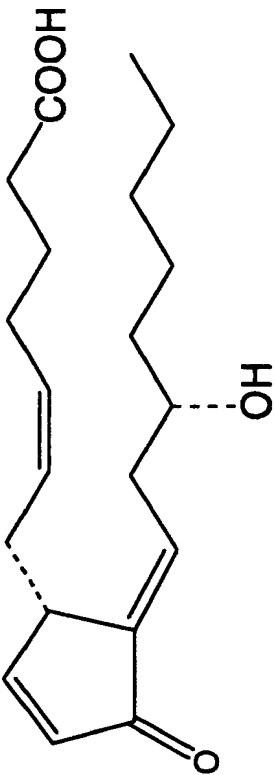
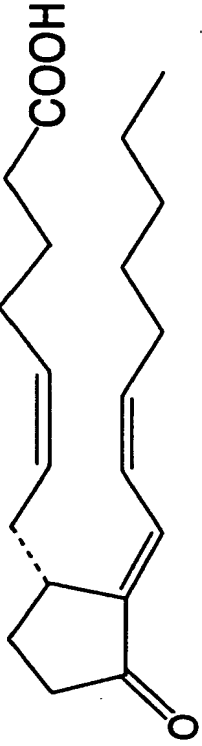
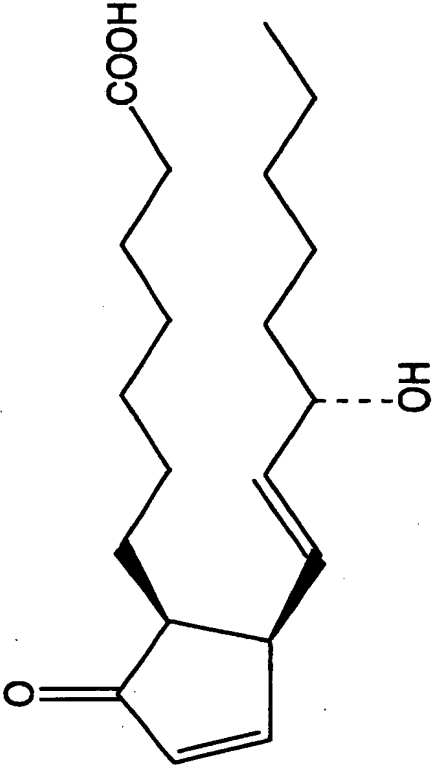
17-ph nyl trinor Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	O 10 μM
17-ph nyl trinor- 13,14-dihydro Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	O 10 μM
19(R)-hydroxy Prostaglandin A <sub>2</sub>		x	x	x



表 1 2

15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - Prostaglandin A <sub>1</sub>		x	x	x
Prostaglandin J <sub>2</sub>		x	x	x
15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ - Prostaglandin J <sub>2</sub>		x	O 10 μM	x

表 1 3

$\Delta^{12}$ -Prostaglandin $J_2$		x	x	ND
9,10-dihydro-15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -Prostaglandin $J_2$ (CAY10410)		x	x	O 10 $\mu$ M
8-iso Prostaglandin $A_1$		x	x	ND

なお、上記表中の ND は、未試験であることを示す。

EXAMPLE 6

バーチャル化合物

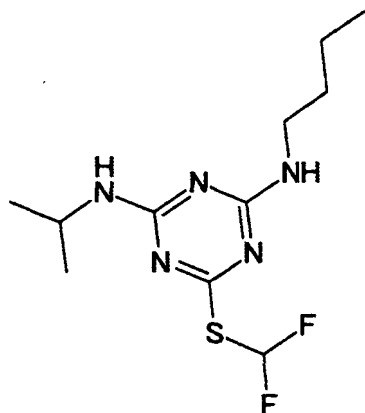
- 5      ファーマコフォアモデルにより、PGA誘導体の Nor1 リガンド結合領域に対する結合位置をシミュレートし（図6）、PGA誘導体のレポーター系における構造活性相関情報から、結合ポケットに同様にはまるPGA誘導体以外の化合物をカタリストDBにより選択した（BioByte Master File 2001 39,383 化合物、2,198,646 confs よりスクリーニング）。シミュレーションの結果、強く結合する化合物として選ばれた155化合物のリスト（含む構造式）を表14～49、次に選ばれてきた281化合物のリストを表50～58に示す。
- 10

表 1 4

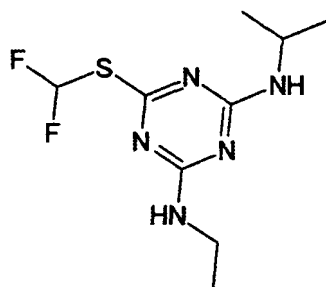
CCCCNc1nc(NCC)c2nc(SC(F)F)nc12CCCCNc1nc(NCC)c2nc(SC(F)F)nc12CCNc1nc(NCCc2ccc(O)cc2)c2nc(SC(F)F)c2n1

**135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4BUTYLAMINO6METHYLAMINO**

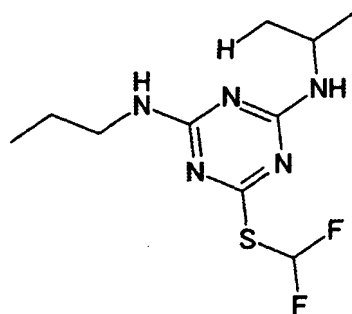
表 15



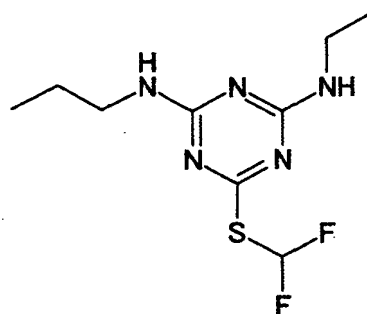
135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4IPROPYLAMINO6BUTYLAMINO



135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4IPROPYLAMINO6ETHYLAMINO

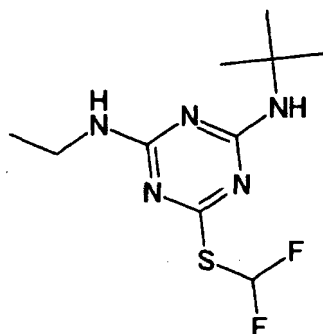


135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4IPROPYLAMINO6PROPYLAMINO

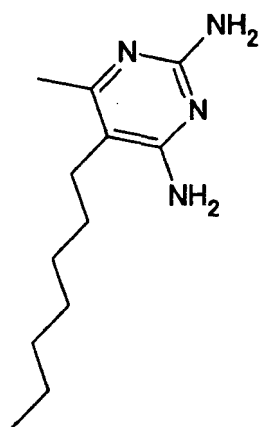


135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4PROPYLAMINO6ETHYLAMINO

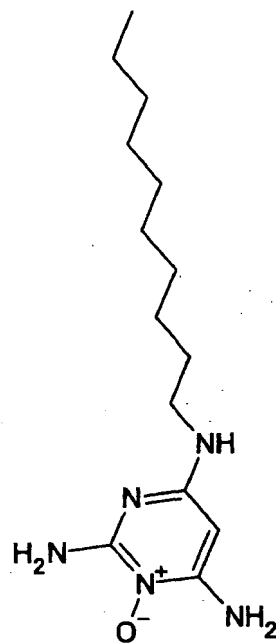
表 16



135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4TBUTYL6ETHYLAMINO

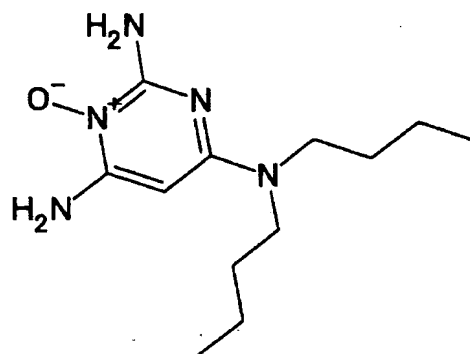


24DIAMINO5HEPTYL6MEPYRIMIDINE

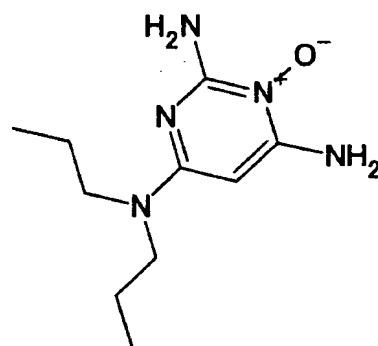


24DIAMINO6DECYLAMINOPYRIMIDINE3OXIDE

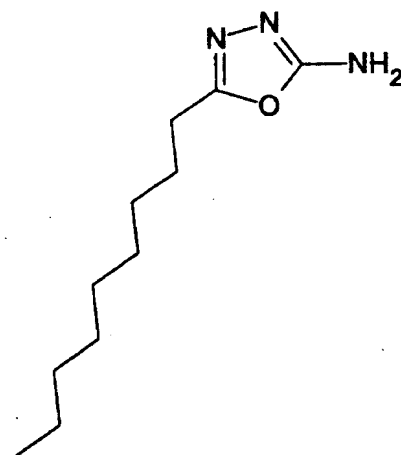
表 17



24DIAMINO6DIBUTYLAMINOPYRIMIDINE3OXIDE

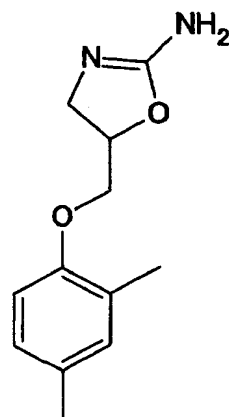


24DIAMINO6DIPROPYLAMINOPYRIMIDINE3OXIDE

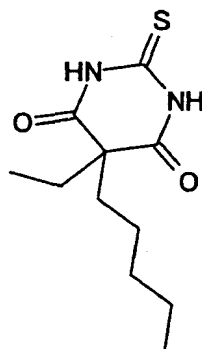


2AMINO5NONYL134OXADIAZOLE

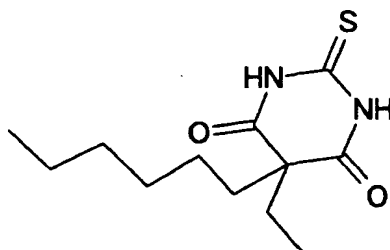
表 18



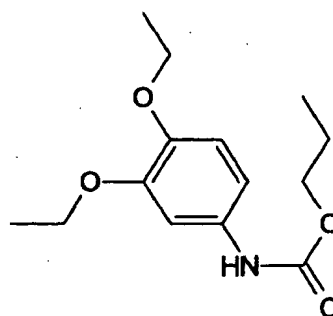
2-((4,6-二甲基苯氧基)甲基)-2-氨基噁唑啉



2-乙基-5-丙基-2-硫-5-氧-1,2,4-三氮杂-4-羧酸



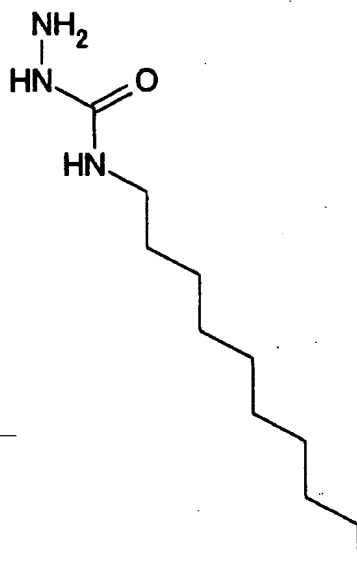
2-乙基-5-己基-2-硫-5-氧-1,2,4-三氮杂-4-羧酸



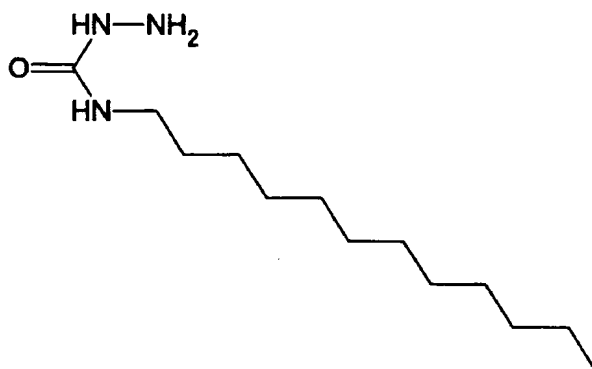
3,4-二乙氧基苯基丙基氨基甲酸酯



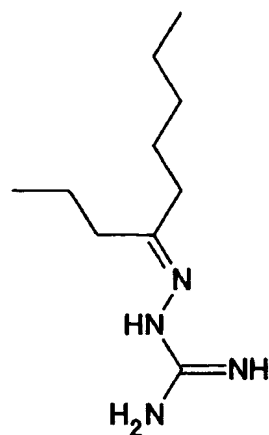
表 1 9



4DECYLSEMICARBAZIDE



4DODECYLSEMICARBAZIDE



4NONANONEGUANYLYLHYDRAZONE

表 20

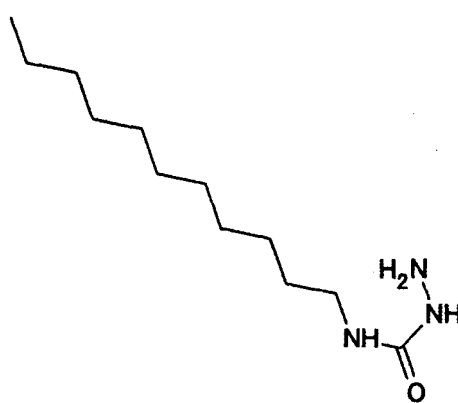
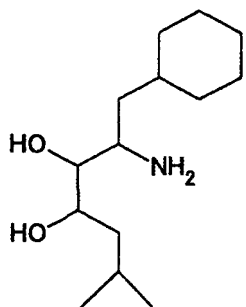
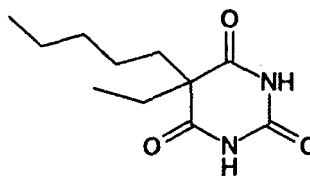
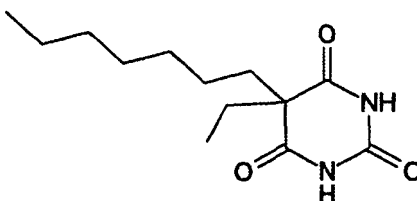
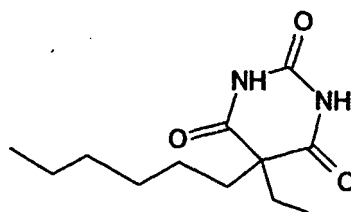

4UNDECYLSemicarbazide

ACDMH

BARBITURICACID5AMYL5ETHYL

BARBITURICACID5HEPTYL5ETHYL

BARBITURICACID5HEXYL5ETHYL

表 2 1

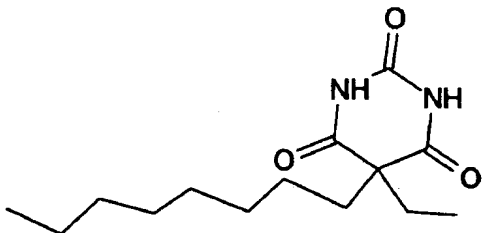
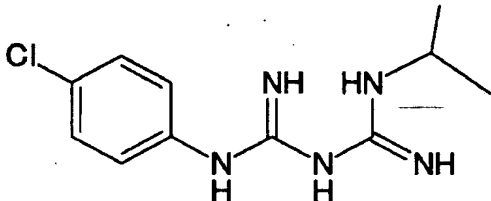
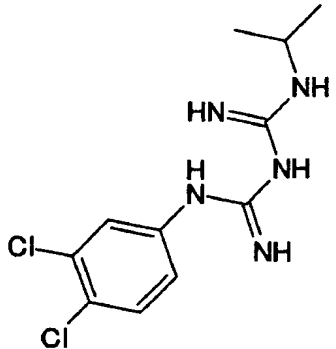
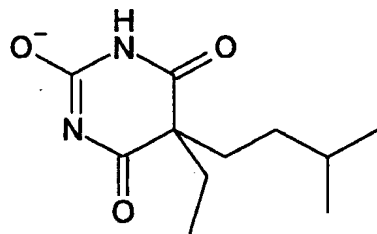
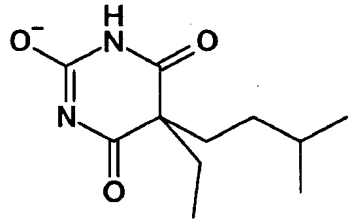
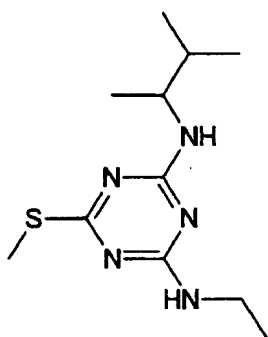
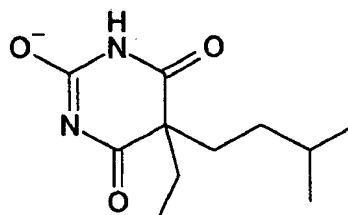
 <p>BARBITURICACID5OCTYL5ETHYL</p>
 <p>CHLOROGUANIDE</p>
 <p>CHLORPROGUANIL</p>
 <p>DIETPROTRIPTYLINESALTAMOBARBITAL</p>
 <p>DIMEPROTRIPTYLINESALTAMOBARBITAL</p>

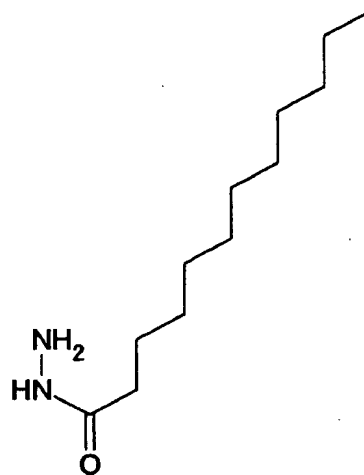
表 2 2



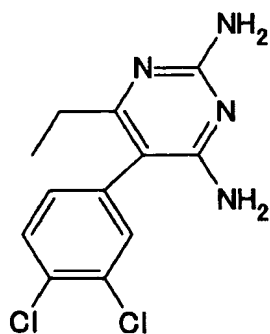
DIMETHAMETRYN



DIPRPROTRIPTYLINESALTAMOBARBITAL

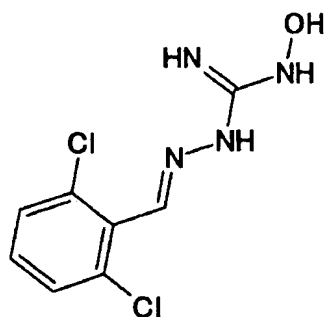


DODECANOICACIDHYDRAZIDE

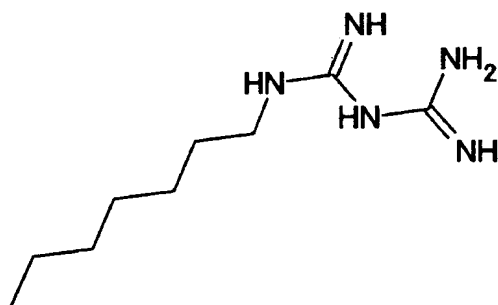


ETOPRINE

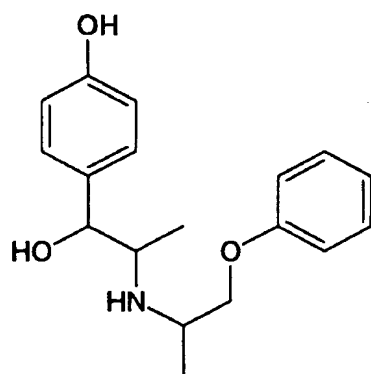
表 2 3



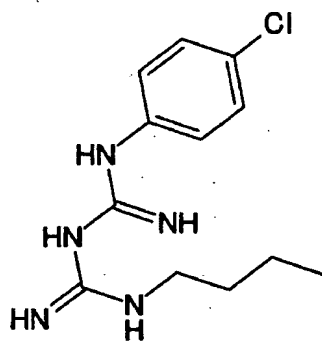
GUANOXABENZ



HEPTYLBIGUANIDE

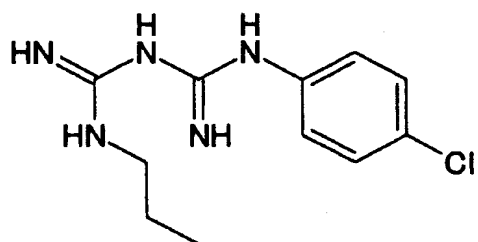


ISOXSUPRINE

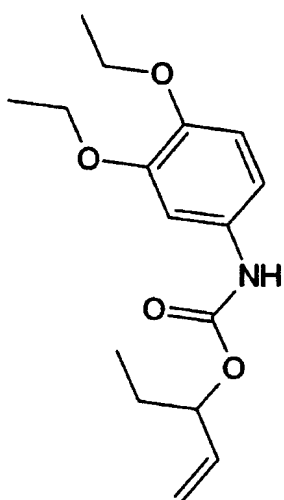


N1PCHLOROPHENYLN5BUTYLBIGUANIDE

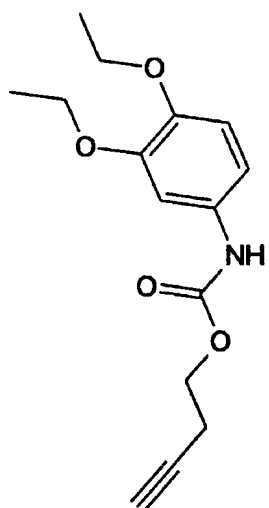
表 2 4



N1-(4-CHLOROPHENYL)-N5-PROPYLBIGUANIDE

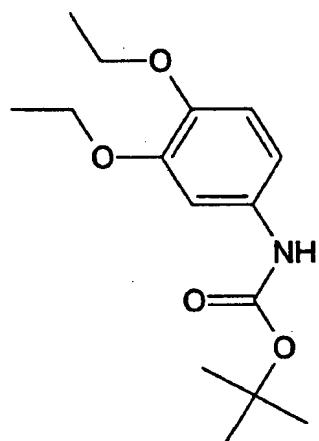


N-(4-DIETHOXYPHENYL)-3-PENTEN-1-YL CARBAMATE

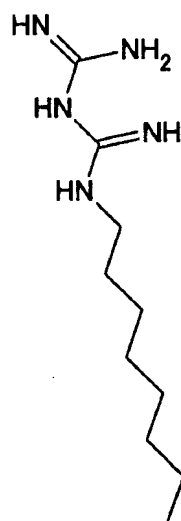


N-(4-DIETHOXYPHENYL)-4-BUTYNYL CARBAMATE

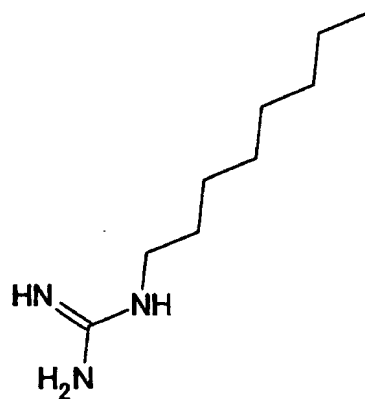
表 2 5



N34DIETHOXYPHENYLCARBAMATETBUTYLESTER

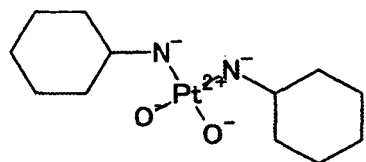


OCTYLBIGUANIDE

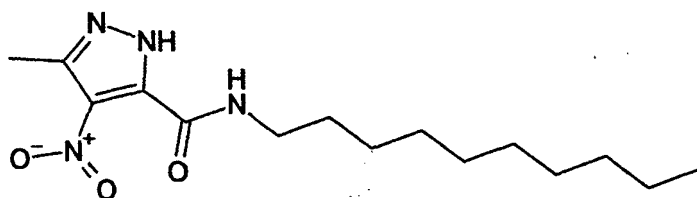


OCTYLGUANIDIUMSULFATE

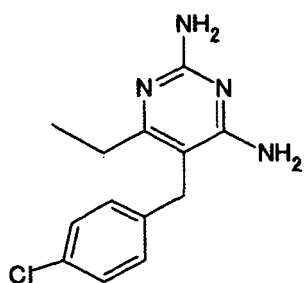
表 26



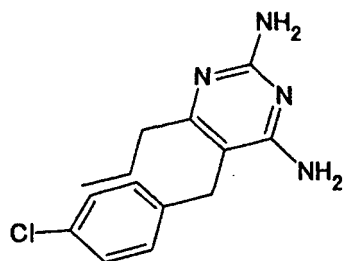
PLATINUMBISCYCLOHEXYLAMMONIODIAQUADINITRATE



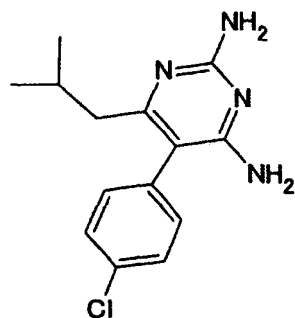
PYRAZOLE3METHYL4NITRO5NDECYLCARBOXAMIDO



PYRIMIDINE24DIAMINO5PCHLOROBENZYL6ETHYL



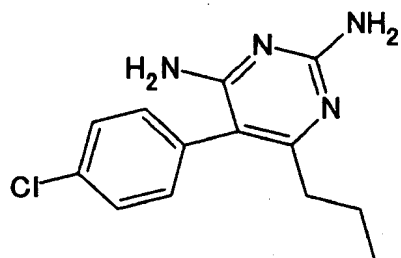
PYRIMIDINE24DIAMINO5PCHLOROBENZYL6PROPYL



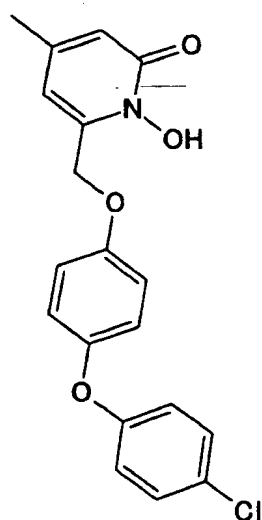
PYRIMIDINE24DIAMINO5PCHLOROPHENYL6IBUTYL



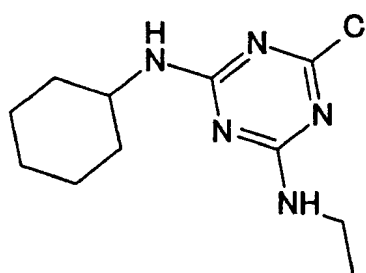
表 27



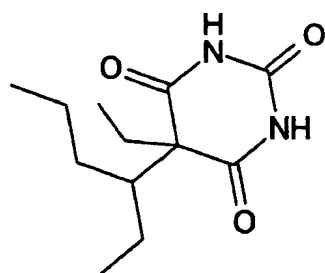
PYRIMIDINE2,4-DIAMINO-5-(4-CHLOROPHENYL)-6-PROPYL



RILOPIROX

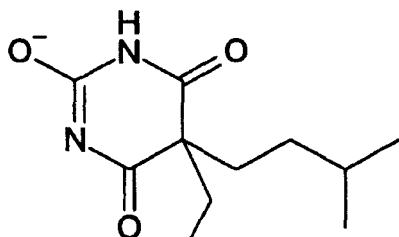


SIMAZINE-2-CYCLOHEXYLAMINE ANALOG

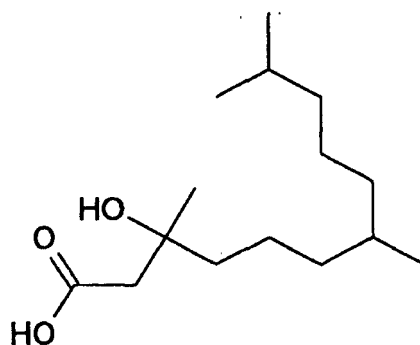


TETRABARBITAL

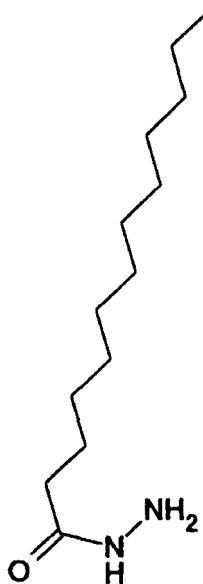
表 2 8



TETRABUTYLAMMONIUMAMOBARBITURATE



TRETHOCANOICACID



TRIDECANOICACIDHYDRAZIDE

表 29

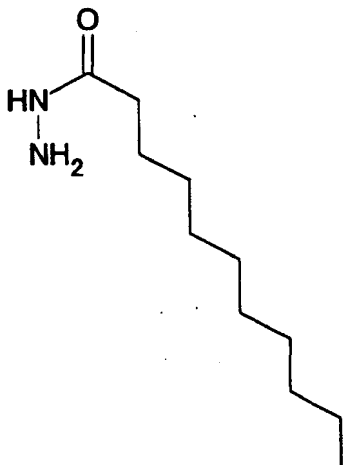
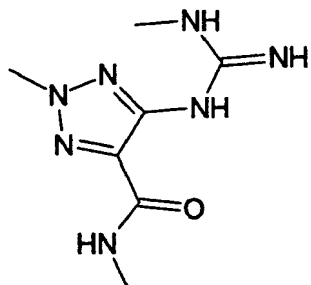
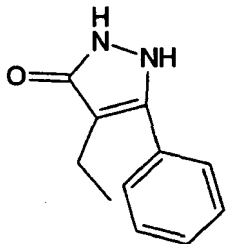
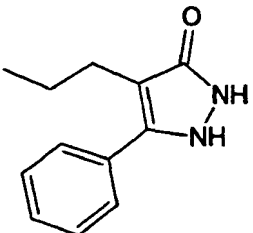
 <p>UNDECANOICACIDHYDRAZIDE</p>
 <p>123TRIAZOLE2METHYL4METHYLCARBAMOYL53METHYLGUANIDINO</p>
 <p>12DIHYDROPYRAZOLONE4ETHYL5PHENYL</p>
 <p>12DIHYDROPYRAZOLONE4PROPYL5PHENYL</p>

表 3 0

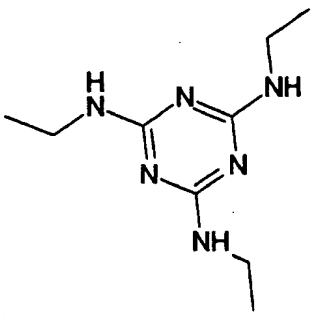
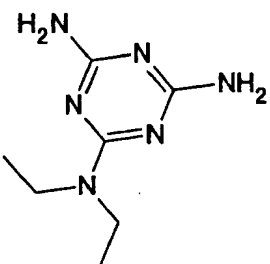
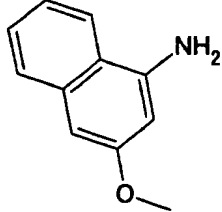
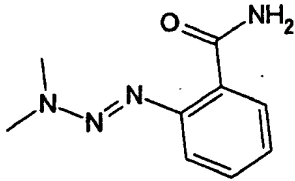
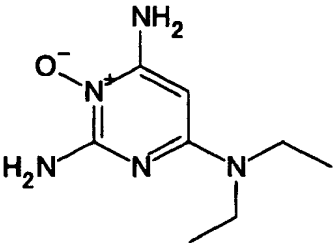
 <p>1,3,5-triazine-2,4,6-triethylamino</p>	 <p>1,3,5-triazine-2,4-diamino-6-diethylamino</p>
 <p>1-naphthaleneamine-3-methoxy</p>	 <p>2,3-dimethyl-1-triazinobenzamide</p>
 <p>2,4-diamino-6-diethylaminopyrimidine-3-oxide</p>	

表 3 1

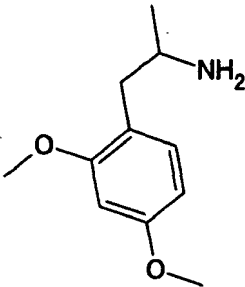
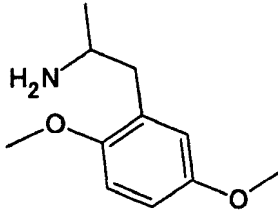
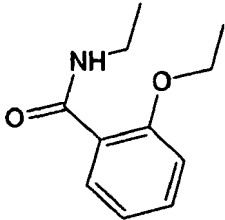
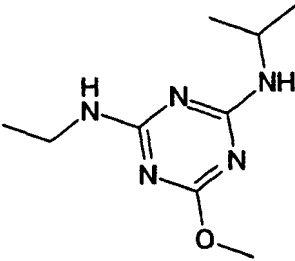
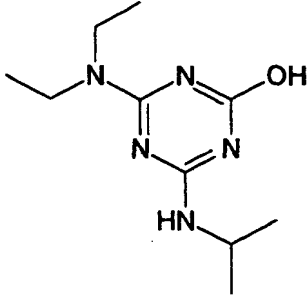
 <p>2,4-DIMETHOXYAMPHETAMINE</p>
 <p>2,5-DIMETHOXYAMPHETAMINE</p>
 <p>2-ETHOXYBENZAMIDENETHYL</p>
 <p>2-METHOXY-4-ETHYL-6-ISOPROPYL-1,3,5-TRIAZINE</p>
 <p>2-OH-4-DIETHYLAMINO-6-ISOPROPYL-1,3,5-TRIAZINE</p>

表 3 2

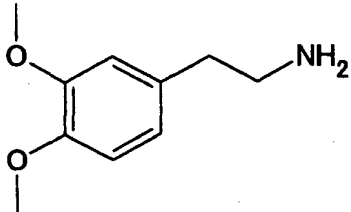
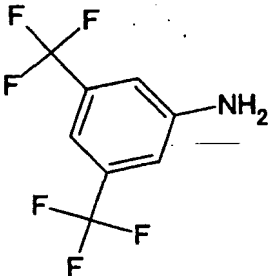
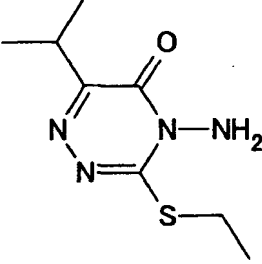
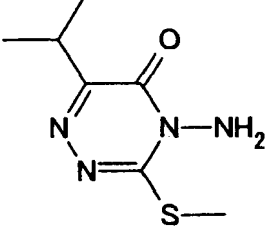
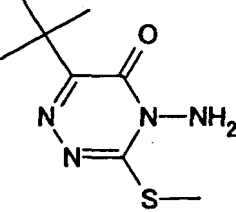
 <p>3,4-DIMETHOXYPHENETHYLAMINE</p>
 <p>3,5-BISTRIFLUOROMETHYLANILINE</p>
 <p>3-ETHYLTHIO-4-AMINO-6-IPR-1,2,4-TRIAZINE-5-ONE</p>
 <p>3-METHYLTHIO-4-AMINO-6-IPR-1,2,4-TRIAZINE-5-ONE</p>
 <p>3-METHYLTHIO-4-AMINO-6-TBU-1,2,4-TRIAZINE-5-ONE</p>

表 3 3

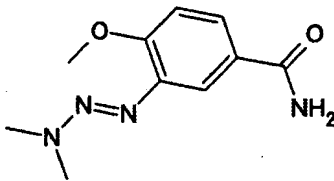
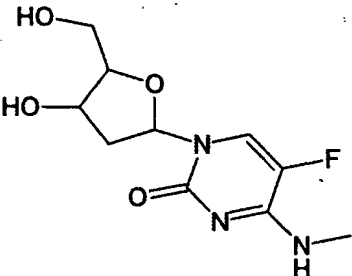
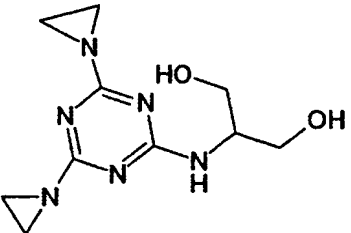
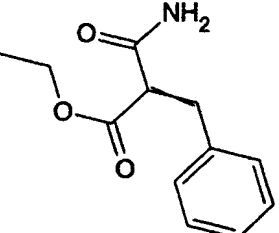
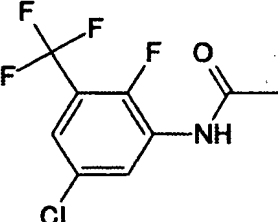
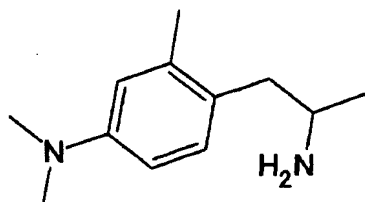
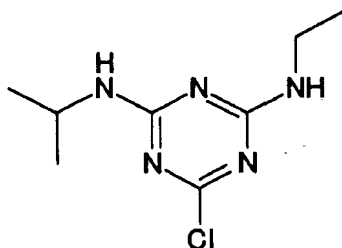

<p>4METHOXY333DIMETHYLTRIAZENOBENZAMIDE</p>

<p>5FLUORONMETHYL2DEOXYCYTIDINE</p>

<p>6BISHOCH2MEAMINO24DIAZIRIDINYLTRIAZINE</p>

<p>AAMIDOETHYLCINNAMATE</p>

<p>ACETANILIDE2FLUORO3TRIFLUOROMETHYL5CHLORO</p>

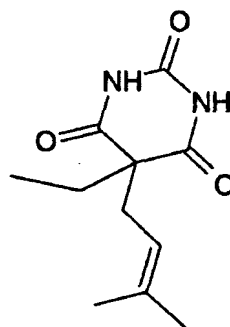
表 3 4



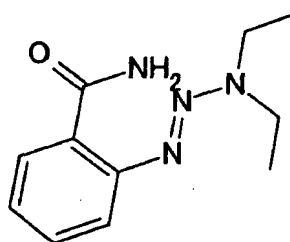
AMIFLAMINE



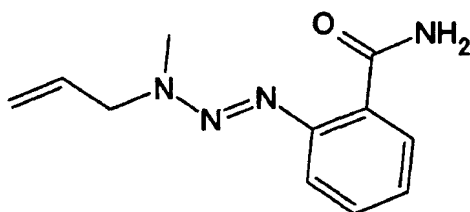
ATRAZINE



BARBITURICACID5ETHYL3METHYLBUTEN2YL



BENZAMIDE233DIETHYLTRIAZENYL



BENZAMIDE23METHYL3ALLYLTRIAZENYL



表 3 5

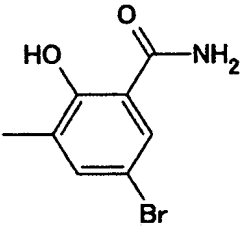
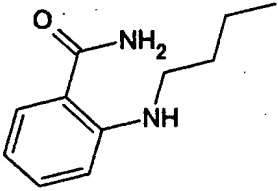
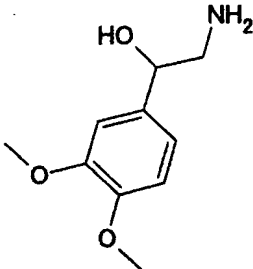
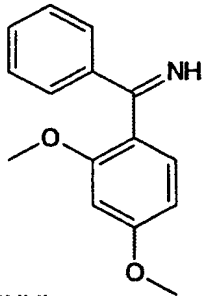
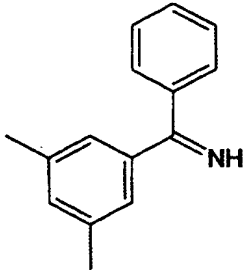
 <p>BENZAMIDE2HYDROXY3METHYL5BROMO</p>
 <p>BENZAMIDEOBUTYLAMINO</p>
 <p>BENZENEETHANEAMINEAHYDROXY34DIMETHOXY</p>
 <p>BENZENEMETHANIMINE24DIMETHOXYAPHENYL</p>
 <p>BENZENEMETHANIMINE35DIMETHYLAPHENYL</p>

表 3 6

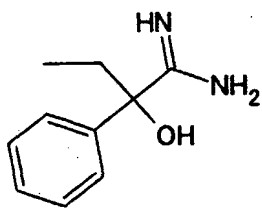
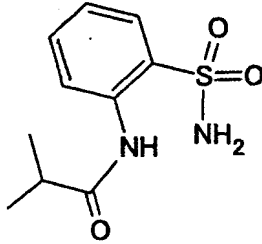
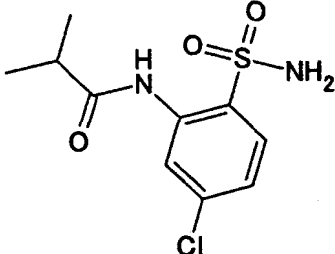
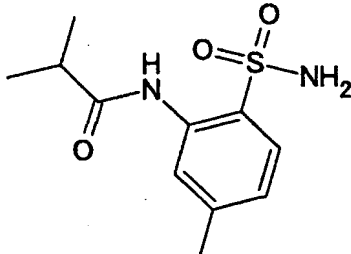
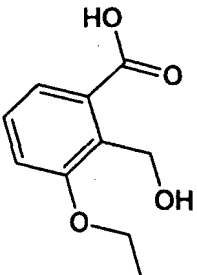
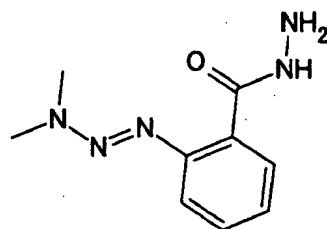
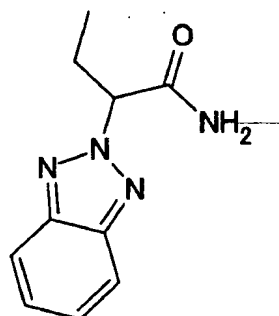
 <p>Chemical structure of 1-ethoxy-2-phenyl-2-hydroxy-1-propanone, showing a benzene ring attached to a central carbon atom. This central carbon is also bonded to a hydroxyl group (OH), an ethoxy group (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), and a 1-aminopropan-2-yl group (CH(CH<sub>3</sub>)CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>).</p>	<p>BENZENEMETHANOLAETHYLAAMIDINO</p>
 <p>Chemical structure of 2-((2-aminophenyl)amino)propanoic acid, showing a benzene ring with an amino group (NH<sub>2</sub>) at the 2-position and a 2-aminopropanamido group (NHCH(CH<sub>3</sub>)COOH) at the 1-position.</p>	<p>BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO</p>
 <p>Chemical structure of 2-((4-chlorophenyl)amino)propanoic acid, showing a benzene ring with a chlorine atom (Cl) at the 4-position and a 2-aminopropanamido group (NHCH(CH<sub>3</sub>)COOH) at the 1-position.</p>	<p>BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO4CHLORO</p>
 <p>Chemical structure of 2-((4-methylphenyl)amino)propanoic acid, showing a benzene ring with a methyl group (CH<sub>3</sub>) at the 4-position and a 2-aminopropanamido group (NHCH(CH<sub>3</sub>)COOH) at the 1-position.</p>	<p>BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO4METHYL</p>
 <p>Chemical structure of 2-ethoxy-2-hydroxy-1-phenylpropanoic acid, showing a benzene ring attached to a central carbon atom. This central carbon is also bonded to a hydroxyl group (OH), an ethoxy group (OCH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), and a carboxylic acid group (COOH).</p>	<p>BENZOICACID2HYDROXYMETHYL3ETHOXY</p>

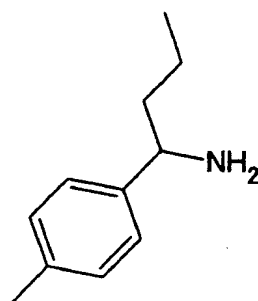
表 3 7



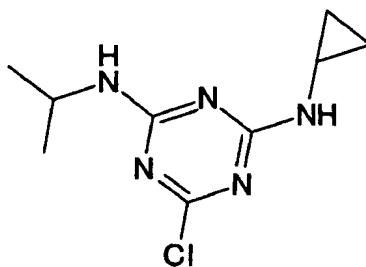
BENZOICACIDHYDRAZIDE O33 DIMETRIAZINO



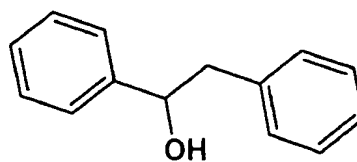
BENZOTRIAZOLE 22 BUTYRAMIDE



BUTYLAMINE 1 PTOLYL

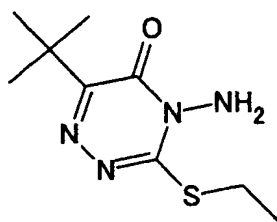


CYPRAZINE

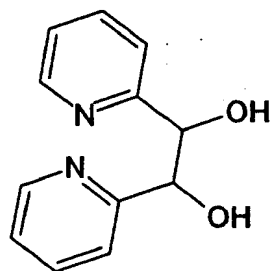


ETHANOL 12 DIPHENYL

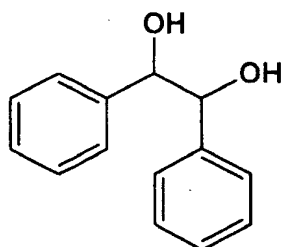
表 3 8



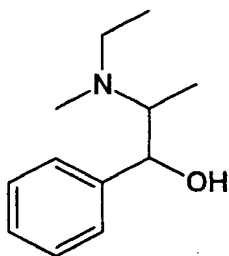
ETHIOZIN



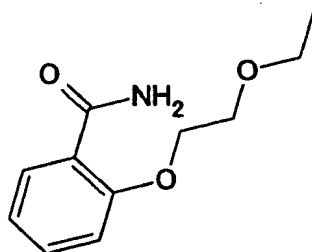
ETHYLENEGLYCOL 1,2-BIS(2-PYRIDYL)



ETHYLENEGLYCOL 1,2-DIPHENYL

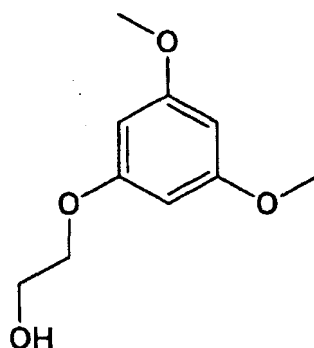


ETHYLEPHEDRINE

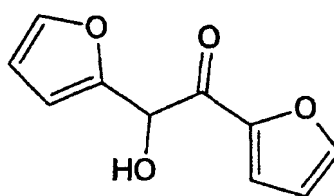


ETOSALAMIDE

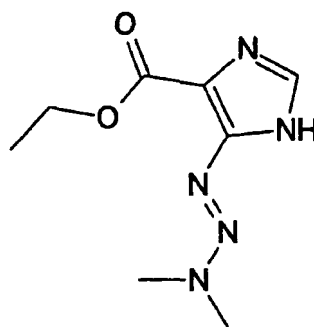
表 3 9



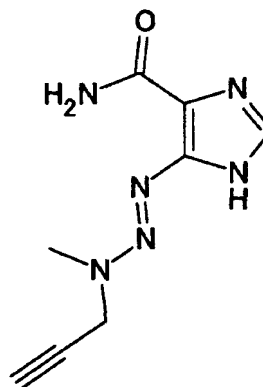
FLOVERINE



FURAN2CHOHCOFURYL

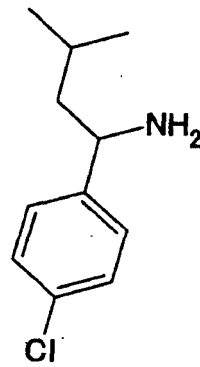


IMIDAZOLE4ETHOXYCARBONYL533DIMETHYLTRIAZENYL

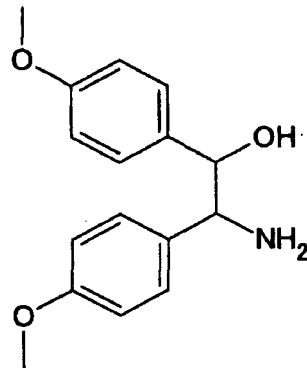


IMIDAZOLE5CARBOXAMIDE43METHYL3PROPYNYLTRIAZENYL

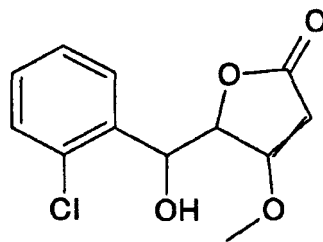
表 4 0



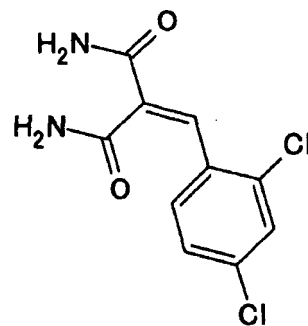
IPENTYLAMINEA4CHLOROPHENYL



ISOLADOL

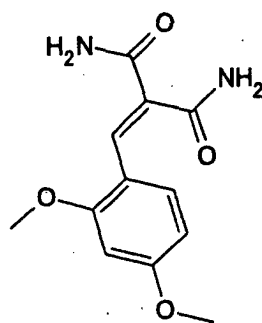


LOSIGAMONE

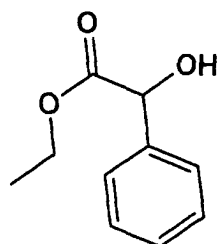


MALONAMIDE24DICHLOROBENZAL

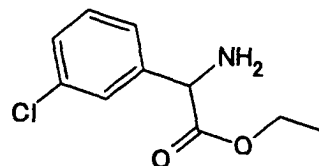
表 4 1



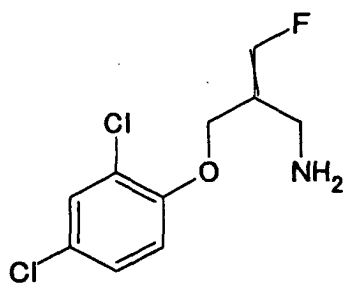
MANLONAMIDE24DIMETHOXYBENZAL



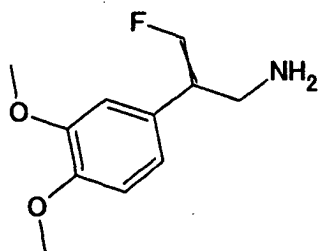
MANDELICACIDETHYLESTER



MCHLOROPHENYLGLYCINEETHYLESTER

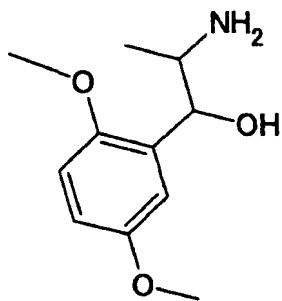


MDL72145

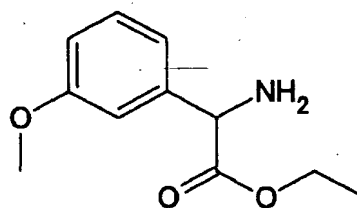


MDL72638

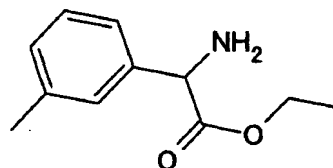
表 4 2



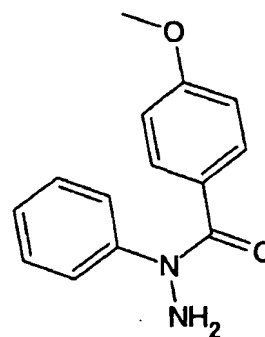
METHOXAMINE



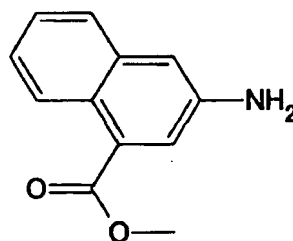
MMETHOXYPHENYLGLYCINEETHYLESTER



MMETHYLPHENYLGLYCINEETHYLESTER



N1PHENYLN1PMETHOXYBENZOYLHYDRAZINE



NAPHTHALENE2AMINO4METHOXYCARBONYL



表 4 3

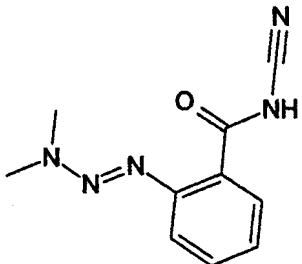
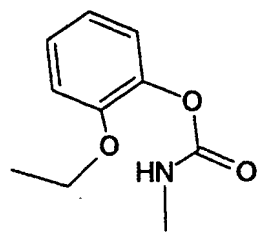
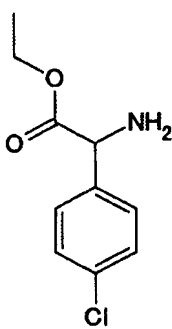
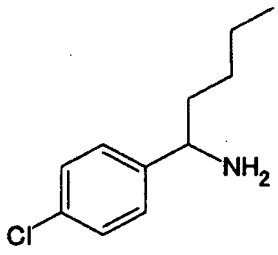
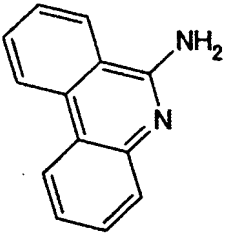
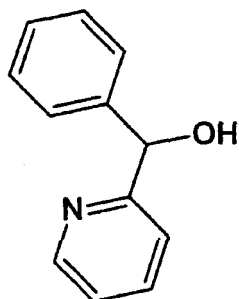
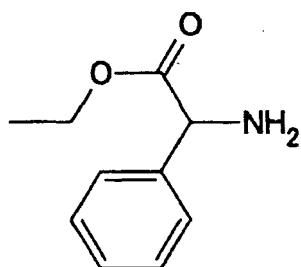
 <p>NCYANO233DIMETHYL1TRIAZENOBENZAMIDE</p>
 <p>NMETHYL2ETHOXYPHENYLCARBAMATE</p>
 <p>PCHLOROPHENYLGLYCINEETHYLESTER</p>
 <p>PENTYLAMINEAPCHLOROPHENYL</p>
 <p>PHENANTHRIDINE6AMINO</p>

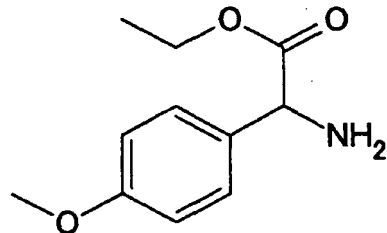
表 4 4



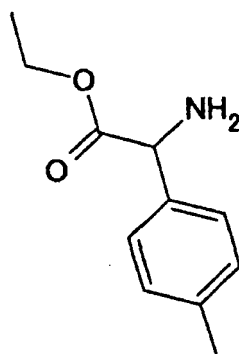
PHENYLAPYRIDYLCARBINOL



PHENYLGLYCINEETHYLESTER

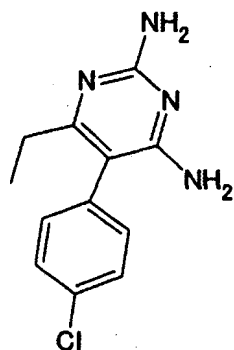


PMETHOXYPHENYLGLYCINEETHYLESTER

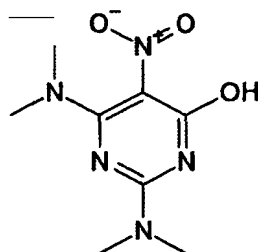


PMETHYLPHENYLGLYCINEETHYLESTER

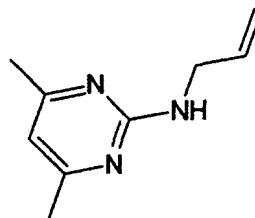
表 4 5



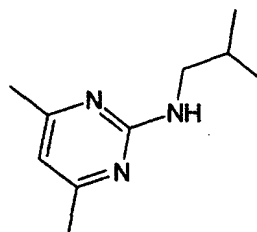
PYRIMETHAMINE



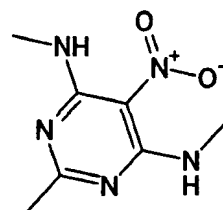
PYRIMIDINE24BISDIMETHYLAMINO6HYDROXY5NITRO



PYRIMIDINE2ALLYLAMINO46DIMETHYL



PYRIMIDINE2IBUTYLAMINO46DIMETHYL



PYRIMIDINE2METHYL46BISMETHYLAMINO5NITRO

表 4 6

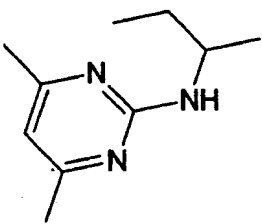
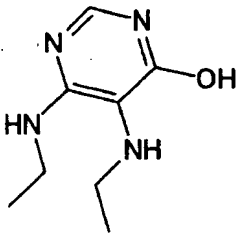
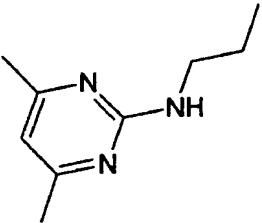
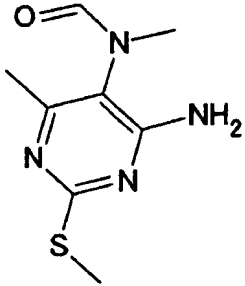
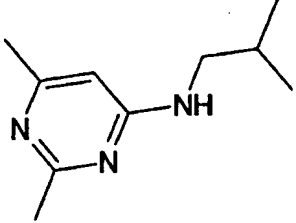
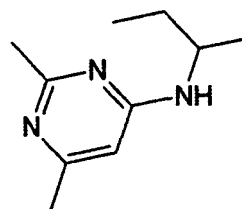
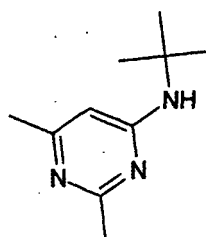
 <p>PYRIMIDINE2SEC BUTYLAMINO46DIMETHYL</p>
 <p>PYRIMIDINE45BISETHYLAMINO6HYDROXY</p>
 <p>PYRIMIDINE46DIMETHYL2PROPYLAMINO</p>
 <p>PYRIMIDINE4AMINO6METHYL5METHYLFORMAMIDO2METHYLTHIO</p>
 <p>PYRIMIDINE4IBUTYL26DIMETHYL</p>

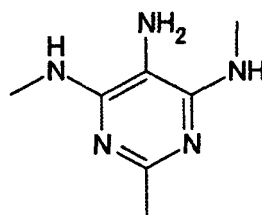
表 4 7



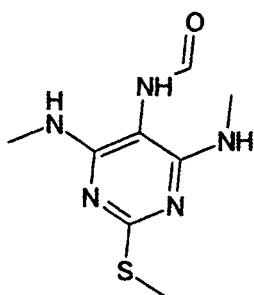
PYRIMIDINE4SECBUTYLAMINO26DIMETHYL



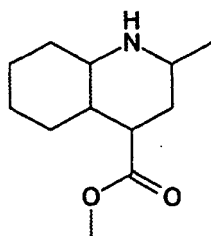
PYRIMIDINE4TBUTYLAMINO26DIMETHYL



PYRIMIDINE5AMINO2METHYL46BISMETHYLAMINO

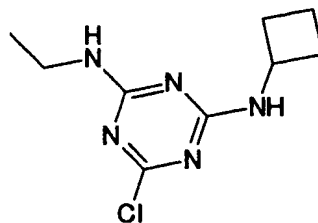


PYRIMIDINE5FORMAMIDO46BISMETHYLAMINO2METHYLTHIO

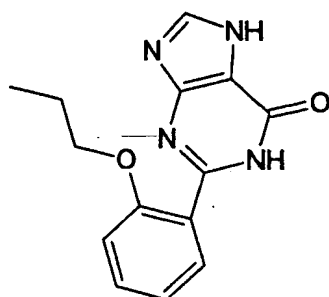


QUINOLINETRANSDECAHYDRO4METHOXYCARBONYL2METHYL

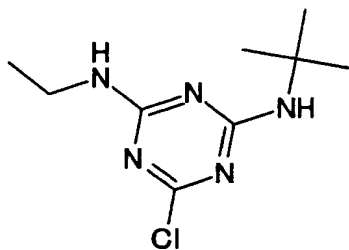
表 4 8



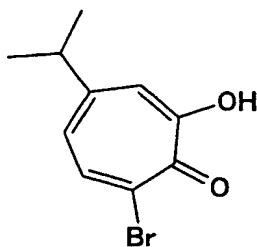
SIMAZINE2CYCLOBUTYLAMINEANALOG



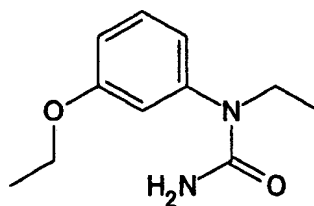
SKF96231



TERBUTHYLAZINE

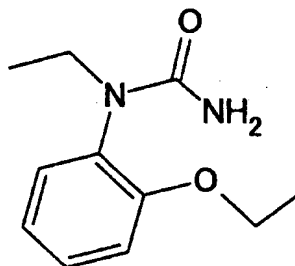


TROPALONE4IPROPYL7BROMO

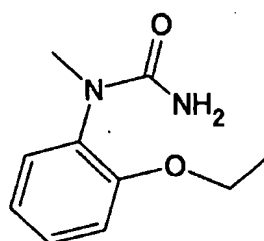


UREA1ETHYL1METHOXYPHENYL

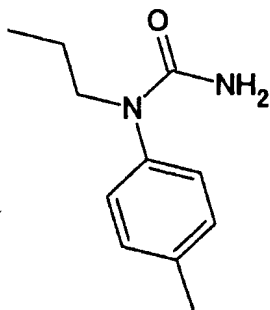
表 4 9



UREA1ETHYL1OETHOXYPHENYL



UREA1METHYL1OETHOXYPHENYL



UREA1PROPYL1PTOLYL

表 50

構造名	MW	LUDI スコア	HB スコア	LPO スコア	Rotbonds	Rule of 5 Violations	CONS. スコア	LIGスコア OFF
10UNDECEN1OL	170.2942	-323	0	0			4	1.49
11DIPHENYLHYDRAZINE	184.2402	-66	0	29	2	0		
1234H4ISOQUINOLINE58DIMETHOXY	193.245	-90	0	5	2	0		
123BUTANETRIONE1DIMETHYLAMINO2OXIME3METHOXY ME	187.198	-95	0	0	5	0		
12DIHYDROPYRAZOLONE4BUTYL5PHENYL	216.2822	-166	0	5			5	2.2
134DIMETHOXYPHENYL2PROPANOL	196.2456	-110	0	35	5	0		
135TRIAZINE246TRIAMINENNDIETHYL	182.2278	-125	0	20	4	0		
135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO46BISETHYLAMINO	249.281	-188	0	8			4	1.75
135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO46BISMETHYLAMINO	221.2274	-145	0	0			4	1.51
135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4ETHYLAMINO6METHYL LAMINO	235.2542	-171	0	0			5	2.24
135TRIAZINE2DIFLUOROMETHIO4TBUTYLAMINO6METH YLAMINO	263.3078	-166	0	5			5	1.11
13PROPANEDIOL2BUTYL2ETHYL	160.2558	-236	0	11			4	1.96
1HYDROXPENTACHLOROCYCLOHEXANE	272.3857	-66	0	29	1	0		
1INDIMETHYLHEXAHYDROFLUOREN4AAMINE	215.3376	-120	0	0	1	0		
1PHENYL13PROPANEDIOL2DICHLOROACETAMIDO	278.1346	-195	0	26			4	1.46
21HPTERIDINONE4AMINO167TRIMETHYL	205.2188	-95	0	0	0	0		
226CL24MEOPHENYLIMINOIMIDAZOLINE	260.1224	-66	0	29	2	0		
226DIETHYLPHENYLIMINOIMIDAZOLIDINE	217.3132	-128	0	17	3	0		
234TRIMETHOXYAMPHETAMINE	225.287	-104	0	41	5	0		
235TRICHLOROPHENOL	197.4481	-95	0	0	1	0		
235TRIMETHYLPHENOL	136.1932	-95	0	0	1	0		
23BENZOOCTAHYDRONAPHTHALENE34DIOH34DIA X	218.295	-63	0	32	2	0		
24DICHLOROBENZYLALCOHOL	177.0298	-118	0	2	2	0		
24DICHLOROPHENYLARSONICACID	270.9313	-90	0	5	3	0		
25DIMETHOXY4METHIOAMPHETAMINE	241.3476	-127	0	44	5	0		
25DIMETHOXY4METHYLAMPHETAMINE	209.2876	-122	0	23	4	0		
26DIMETHYL4PYRIMIDINAMINE	123.1572	-95	0	0	0	0		
2ALLYLPHENOL3METHOXY	164.2036	-145	0	0			4	1.72
2AMINO2TETRAFLUOROETHYL VINYLPHENYLTHIONE	263.2524	-122	0	23	4	0		



表 5 1

2AMINO4METHOXY6TRICHLORMETHYLSYMTRIAZINE	243.4797	-120	0	0	1	0	0	
2CHLOROETHYLN3CHLOROPHENYLCARBAMATE	234.0816	-110	0	35	5	0	0	
2MEO46BISIPROPYLAMINOSTRIAZINE	225.293	-122	0	23	5	0	0	
2METHIO4ETAMINO6IPRAMINOSTRIAZINE	227.3268	-171	0	0		4	1.92	
2METHOXY4MEAMINO6IPROPYLAMINOSTRIAZINE	197.2394	-115	0	5	4	0		
2METHYL4BENZYLAMINO123BENZOTRIAZINIUMIODIDE	251.3103	-107	0	38	3	0		
2METHYLTHIOPHENYLCARBAMATENMETHYL	197.2514	-120	0	0	4	0		
2NNDIETHYLAMINO1PHENYLETHANOL	193.2882	-201	0	20		4	1.56	
2OH46BISETHYLAMINOSTRIAZINE	183.2126	-125	0	20	5	0		
2OH4ETAMINO6DIETAMINOSTRIAZINE	211.2662	-171	0	0		5	1.92	
2OH4ETAMINO6IPROPYLAMINOSTRIAZINE	197.2394	-122	0	23	5	0		
2PYRIDINEAMINE46DIMETHYL	122.1694	-95	0	0	0	0		
2PYRIDONE56BISMETHIOMETHYL	215.3278	-196	0	0		4	2.06	
345TRIMETHOXYAMPHETAMINE	225.287	-125	0	20	5	0		
34DIMETHOXYAMPHETAMINE	195.2608	-128	0	17	4	0		
34DIMETHOXYBENZYLALCOHOL	168.192	-120	0	0	4	0		
35DIBROMOPHENOL	251.905	-95	0	0	1	0		
35DICHLOROANILINE	162.0182	-95	0	0	0	0		
35DICHLOROPHENOL	163.003	-95	0	0	1	0		
35DIGL6H3NHNCNCOOET	286.117	-94	0	26	6	0		
35DIMETHOXY4BROMOPHENETHYLAMINE	260.1301	-113	0	32	4	0		
35DIMETHOXYPHENOL	154.1652	-95	0	0	3	0		
35DIMETHYLANILINE	121.1816	-95	0	0	0	0		
35DIMETHYLPHENOL	122.1664	-95	0	0	1	0		
35DITBUTYLPHENOL	206.3272	-125	0	20	3	0		
3CL6H4NHNCNCOOET	251.6719	-91	0	29	6	0		
3ETOCOPYRIDO12APYRIMIDIN4ONH76ME	238.2858	-100	0	20	3	0		
3METHIO4AMINO6ETHYL124TRIAZINE5ONE	186.2312	-116	0	29	2	0		
3METHIO4AMINO6ME124TRIAZINE5ONE	172.2044	-112	0	8	1	0		
3METHOXY4AMINO6IPR124TRIAZINE5ONE	184.1974	-112	0	8	2	0		
3PHENYLAMINO4AMINO6IPR124TRIAZINE5ONE	245.2834	-91	0	29	3	0		
3PROPYL4IPROPYLPHENOL	178.2736	-171	0	0		5	1.07	
3PYRIDINEMETHANOLA2PROPYNLYLA34DICLPHENYL	292.164	-170	0	26		5	1.47	
3PYRIDINEMETHANOLA2PROPYNLYLA4FLUOROPHENYL	241.2643	-170	0	26		5	1.48	

表 5 2

3PYRIDINEMETHANOLA2PROPYNLA4TOLYL	237.3006	-167	0	29			5	1.06
41HPTERIDINIMINE167TRIMETHYL	189.2194	-95	0	0	0	0		
45DICHLORO2METHOXYPHENOL	193.0292	-95	0	0	2	0		
4ETHYL3PROPYLPHENOL	164.2468	-171	0	0			5	1.3
4METHYLNETHYLHEXAHYDROFLUOREN4AAMINE	229.3644	-110	0	35	2	0		
4OCTANONEGUANYLHYDRAZONE	170.257	-196	0	0			4	1.86
4PTERIDINAMINE12DIHYDRO2IMINE167TRIMETHYL	204.234	-95	0	0	0	0		
5AMINO124DICHLOROPHENYLTETRAZOLE	230.056	-81	0	14	1	0		
5NONANOL	144.2564	-224	0	23			4	1.55
5NONANOL5BUTYL	200.3636	-300	0	23			4	1.89
622DIME5ME13DIOXAN5YLAM24DIAZIRIDTRIAZ	306.3668	-120	0	0	4	0		
62PENHYDROPYRANYL4AM3METHIO124TRIAZINONE	242.2952	-64	0	56	2	0		
6IPROPYL4AMINO3MEAMINO124TRIAZIN5ONE	183.2126	-120	0	0	2	0		
8QUINOLINAMINE6METHOXY	174.2018	-95	0	0	1	0		
8QUINOLINOL6TRIFLUOROMETHYL	213.1587	-120	0	0	1	0		
AAMIDO4METHYLETHYL CINNAMATE	233.2664	-120	0	0	5	0		
AAMIDOMETHYL CINNAMATE	205.2128	-72	0	23	4	0		
ACETANILIDE23DICHLORO5TRIFLUOROMETHYL	272.0537	-120	0	0	2	0		
ACETANILIDE2BROMO35DICHLORO	282.9515	-95	0	0	2	0		
ACETANILIDE2BROMO3TRIFLUOROMETHYL5CHLORO	316.5047	-120	0	0	2	0		
ACETANILIDE2CHLORO3TRIFLUOROMETHYL5BROMO	316.5047	-120	0	0	2	0		
ACETANILIDE35DIMETHYL	163.2188	-95	0	0	2	0		
AJMALINE	326.4376	-97	0	23	3	0		
ANILINE2METHOXY5CHLORO	157.5993	-95	0	0	1	0		
ANILINE2METHOXY5METHYL	137.181	-95	0	0	1	0		
ANILINE35DIBROMO	250.9202	-95	0	0	0	0		
ANILINE35DIIDO	344.9212	-95	0	0	0	0		
ANILINE35DIMETHOXY	153.1804	-95	0	0	2	0		
ANILINE3CHLORO5METHOXY	157.5993	-95	0	0	1	0		
ANTAZONITE	268.348	-171	0	0			5	0.78
APHENYLBUYRAMIDE	163.2188	-157	0	14			4	1.85
ASPARTICACIDDIETHYLESTER	189.2108	-192	0	29			4	1.83
ASPIDINOL	224.256	-122	0	23	6	0		
BAYA6781	210.3186	-125	0	20	2	0		

表 53

BENZAMIDE23AZETIDINYLTRIAZENE	204.231	-95	0	0	3	0		
BENZAMIDE23METHYL3BUTYLTRIAZENYL	234.3004	-109	0	62	6	0		
BENZAMIDE23METHYL3ETHYLTRIAZENYL	206.2468	-100	0	20	4	0		
BENZAMIDEODICHLOROACETYLAMINO	247.0804	-118	0	2	4	0		
BENZAMIDEOISOPROPYLAMINO	178.2334	-91	0	29	3	0		
BENZENEETHANEAMINE2METHOXY	151.2078	-131	0	14	3	0		
BENZENEETHANEAMINEAHYDROXYNETHYL34DIMETHOXY	225.287	-191	0	5		4	1.82	
BENZENEETHANEAMINEAHYDROXYNMETHYL34DIMETHOXY	211.2602	-169	0	2		5	2.34	
BENZENEETHANEAMINENSUBUTYLAHYDROXY34DIMETHOXY	253.3406	-216	0	5		4	1.82	
BENZENEMETHANAMINE34DIMETHOXY	167.2072	-118	0	2	3	0		
BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO	242.2922	-110	0	35	4	0		
BENZENESULFONAMIDE2IBUTYROYLAMINO4METHOXY	272.3184	-116	0	29	5	0		
BENZIMIDAZOLE2HYDROXYMETHYL1METHYL	162.1908	-120	0	0	2	0		
BENZOFURAN3AMINE23DIHYDRO5METHYLNIPYRROLIDINYLACETYL	260.3352	-127	0	44	4	0		
BENZOPHENONEHYDRAZONE	196.2512	-90	0	5	2	0		
BENZOTRIAZOLE12HEXANAMIDE	232.2846	-204	0	17		4	1.48	
BENZYLALCOHOL2HYDROXY35DICHLORO	193.0292	-118	0	2	3	0		
BENZYLALCOHOL35DIBROMO2HYDROXY	281.9312	-118	0	2	3	0		
BENZYLALCOHOL35DIMETHOXY4HYDROXY	184.1914	-120	0	0	5	0		
BENZYLALCOHOL35DIMETHOXYCARBONYL	229.2502	-116	0	29	4	0		
BETABENZALBUTYRAMIDE	175.2298	-119	0	26	3	0		
BICYCLO310HEXAN3OL4METHYL1ISOPROPYL	154.2516	-120	0	0	2	0		
BUTYLAMINE1PHENYL	149.2352	-148	0	23		4	1.41	
C3C1BUTENYL4CHYDROXYMECYCLOPENTENE	152.2358	-171	0	0		5	0.78	
CGP39551	237.19186	-207	0	14		4	2.32	
COMG1774	237.3412	-212	0	35		4	1.58	
CYANAZINE	240.6949	-171	0	0		5	1.28	
CYPENAMINE	161.2462	-93	0	2	1	0		
CYPRODINIL	225.2926	-95	0	0	3	0		
DAZADROL	287.7481	-127	0	44	4	0		

表 5 4

DECANOICACIDHDRAZIDE	186.2966	-297	0	0			4	1.44
DESETHYLATRAZINE	187.6315	-120	0	0	2	0		
DESIOPROPYLATRAZINE	173.6047	-106	0	14	2	0		
DIACETONEGLUCOSE	260.2864	-45	0	50	2	0		
DIHYDROCODEINE	301.3846	-81	0	14	2	0		
DIHYDROMORPHINE	287.3578	-90	0	5	2	0		
DIMETHIRIMOL2	209.2906	-171	0	0			5	2.36
DIMETHYL GUAIACOL	152.1926	-95	0	0	2	0		
DIMETHYLKETOMALONATEOXIME	161.114	-90	0	5	5	0		
DIMETHYL TARTRATE	178.1414	-171	0	0			4	1.86
DIMETOFRINE	227.2596	-171	0	0			5	2.49
DIPROBUTINE	157.2984	-227	0	20			4	1.47
DIPROPYLHYDANTOIN	184.2376	-191	0	5			4	2.02
DOM-3	209.2876	-125	0	20	4	0		
ECGONINEMETHYLESTER	199.2492	-115	0	5	3	0		
ECTYLUREA	156.184	-120	0	0	4	0		
EFAROXAN	216.2822	-97	0	23	2	0		
ETHANOLAMINENPROPYLN2HYDROXYBUTYL	175.2704	-270	0	2			4	2.27
ETHANOLAMINENTBUTYLN2HYDROXYBUTYL	189.2972	-64	0	56	8	0		
ETHENZAMIDE	165.1914	-91	0	29	3	0		
ETHYLAMINEN2HYDROXYPROPYLN2HYDROXYBUTYL	175.2704	-247	0	0			4	1.86
ETHYLAMINENNBIS2HYDROXYBUTYL	189.2972	-272	0	0			4	2
ETHYLENEGLYCOL12BIS6METHYLPYRID2YL	244.2926	-171	0	0			5	1.31
FENIPENTOL	164.2468	-182	0	14			4	1.99
FLUORENE9HYDROXYMETHYL	196.2482	-120	0	0	2	0		
FR115427	223.317	-54	0	41	1	0		
GLYCEROL13DIETHYLETHER	148.2016	-218	0	29			4	1.74
GUAJETOLIN	212.245	-196	0	0			4	2.59
HEXANOICACID2ACETYLAMINOMETHYLESTER	187.2382	-198	0	23			4	1.8
HEXAPRADOL	283.4126	-249	0	23			4	2.15
HEXYLAMINE1PHENYL	177.2888	-195	0	26			4	1.99
HYDROQUINONE23DIMETHOXY5METHYL	184.1914	-95	0	0	4	0		
HYDROQUINONE26DICHLORO	179.0024	-95	0	0	2	0		
HYDROQUINONE26DIMETHOXY	170.1646	-95	0	0	4	0		

表 5 5

HYDROQUINONE2METHYL6BROMO	203.0351	-95	0	0	2	0		
HYDROXYATRAZINE2	197.2394	-119	0	26	4	0		
IMIDAZOLE4CARBOXAMIDE53BISCHLOROETHYLTRIAZ							4	1.47
INYL	279.1284	-196	0	0				
INDANOREX	191.2724	-107	0	38	3	0		
ISOLEUCINENACETYLN METHYLAMINOAMIDE	186.2534	-167	0	29			5	0.91
LEUCINEETHYLESTER	159.2278	-176	0	20			4	1.77
LUPININE	169.2662	-120	0	0	2	0		
METHAMINAZOLAMIDE	251.2778	-120	0	0	3	0		
METHYLBENZOATE2SULFONAMIDO	215.2234	-109	0	11	3	0		
MILSTEM	209.2906	-95	0	0	6	0		
MISONIDAZOLEFLUORO	219.1721	-219	0	2			4	1.94
MORPHOLINE325DIMETHOXYPHENYL	223.2712	-75	0	20	3	0		
N2N2N4N4TETRAMETHYLMELAMINE	182.2278	-95	0	0	2	0		
N2TBUTYLN1BENZENESULFONYLUREA	256.319	-130	0	41	5	0		
NAPHTHALENE1AMINO3CHLORO	177.6329	-112	0	8	0	0		
NBUTYL4CHLOROCINNAMAMIDE	237.7285	-118	0	53	6	0		
NMECARBAMICACIDOCYCLOPENTENYLPHENYLESTER	217.267	-95	0	0	4	0		
NMETHYL2ETHYLPHENYL CARBAMATE	179.2182	-120	0	0	4	0		
NMETHYL2IPROPOXYPHENYL CARBAMATE	209.2444	-120	0	0	5	0		
NMETHYL CARBAMATE3IPROPYL5METHYLPHENYL	207.2718	-120	0	0	4	0		
NMETHYL CARBAMATE OSBUTYLPHENYL	207.2718	-101	0	44	5	0		
NMETHYL CARBAMICACIDOCYCLOPENTYLPHENYLEST								
ER	219.2828	-95	0	0	4	0		
NNDIETHYLANILINEMHYDROXY	165.2346	-145	0	0			4	1.41
NOMETHOXYPHENYL3NIPERIDINOACETAMIDE	248.3242	-110	0	35	5	0		
NORALPRENOLOL	207.2718	-221	0	0			4	1.86
NSC118742	196.2546	-95	0	0	3	0		
OBENZYL OXY BENZAMIDE	227.2622	-119	0	26	4	0		
OCTAHYDROPHENANTHREN4AAMINE9METHYL	215.3376	-87	0	8	0	0		
OPMETHYLBENZYL OXY BENZAMIDE	241.289	-104	0	41	4	0		
OPTUNAL	289.28546	-109	0	11	6	0		
OSDIMENPRPHOSPHORAMIDOTHIOATE	183.20486	-127	0	44	5	0		
OSDIPROPYLPHPHOSPHORAMIDOTHIOATE	197.23166	-207	0	14			4	1.9

表 5 6

PENTANOICACID2ACETYLAMINOMETHYLESTER	173.2114	-196	0	0	0	0	0	4	2.16
PENTYLAMINEAPHENYL	163.262	-170	0	26				5	1.5
PHENAMACIDE	221.2986	-207	0	14				4	1.56
PHENOL2ETHYL5METHYL	136.1932	-120	0	0	2	0	0		
PHENOL2METHOXY4ETHYL	152.1926	-120	0	0	3	0	0		
PHENOL3DIETHOXYPHOSPHINYL	230.19986	-125	0	20	6	0	0		
PHENOL3ETHYL4METHYL	136.1932	-120	0	0	2	0	0		
PHENOL5ETHYL3METHYL	136.1932	-120	0	0	2	0	0		
PHENYLALANINEMETHYLESTER	179.2182	-171	0	0				4	1.89
PHENYLBORONICACID246TRIMETHYL	164.0105	-120	0	0	3	0	0		
PHENYLPOTOLYLCARBINOL	198.264	-122	0	23	3	0	0		
PHOSPHORICAMIDEIBUTYLESTER	209.22466	-247	0	0				4	1.7
PHOSPHOROHYDRAZIDICACIDDIPHENYLESTER	264.22006	-78	0	17	5	0	0		
PICOLINHYDROXAMICACID	166.1792	-95	0	0	3	0	0		
PILOCARPICACIDETHYLESTER	254.3284	-272	0	0				4	1.97
PROCYAZINE	252.7059	-171	0	0				5	1.59
PROPYLAMINEN2HYDROXYPROPYLN2HYDROXYBUTYL	189.2972	-272	0	0				4	1.79
PROPYLAMINENNBIS2HYDROXYBUTYL	203.324	-292	0	5				4	2.11
PTERIDINE4AMINO17DIHYDRO16DIMETHYL7OXO	191.192	-95	0	0	0	0	0		
PURINE6ETHYLAMINO2METHYL	177.2084	-120	0	0	2	0	0		
PYRAZINE2AMIDINO56DIMETHYL3METHYLAMINO	179.2242	-90	0	5	2	0	0		
PYRAZOLO34DPPYRIMIDINE46BISMETHYLAMINO	178.1962	-90	0	5	2	0	0		
PYRAZOLO34DPPYRIMIDINE4METHYLAMINO6METHYLTHI O	195.2416	-115	0	5	2	0	0		
PYRIDINE26DICHLORO4HYDROXY	163.9908	-95	0	0	1	0	0		
PYRIDINE2HYDROXY56BISMETHIOMETHYL	215.3278	-196	0	0				4	1.7
PYRIDINE4AMINO26DICHLORO	163.006	-95	0	0	0	0	0		
PYRIDINE4HYDROXY26BISMETHOXYCARBONYL	211.1738	-95	0	0	5	0	0		
PYRIMIDINE12DIHYDRO2MINO146TRIMETHYL	137.184	-95	0	0	0	0	0		
PYRIMIDINE1456TETRAHYDRO2AHYDROXYAMETHYLBE NZYL	204.2712	-110	0	35	3	0	0		
PYRIMIDINE24DIAMINO5BENZYL6METHYL	214.2694	-131	0	14	2	0	0		
PYRIMIDINE24DIAMINO5PCHOROBENZYL6METHYL	248.7145	-113	0	32	2	0	0		
PYRIMIDINE26DIMETHYL4METHYLAMINO	137.184	-95	0	0	1	0	0		

表 5 7

PYRIMIDINE2AMINO26DIMETHOXY	155.156	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE2AMINO46BISDIMETHYLAMINO	181.24	-90	0	5	2	0		
PYRIMIDINE2AMINO46DIMETHYL	123.1572	-95	0	0	0	0		
PYRIMIDINE2AMINO4CHLORO6DIMETHYLAMINO	172.6169	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE2AMINO4CHLORO6METHYLAMINO	158.5901	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE2BUTYL4CHLORO6HYDROXY	186.6407	-118	0	53	4	0		
PYRIMIDINE2BUTYLAMINO46DIMETHYL	179.2644	-166	0	5			5	1.86
PYRIMIDINE2HEXYLAMINO	179.2644	-207	0	14			4	1.91
PYRIMIDINE2HYDRAZINO4METHOXY6METHYL	154.1712	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE2HYDROXY46DIMETHYL	124.142	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE2IPENTYLAMINO46DIMETHYL	193.2912	-166	0	5			5	2.03
PYRIMIDINE456TRISMETHYLAMINO	167.2132	-90	0	5	3	0		
PYRIMIDINE46DIMETHYL2METHYLAMINO	137.184	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE4ACETAMIDO5ETHOXYCARBONYL2METHYL	223.231	-103	0	17	5	0		
PYRIMIDINE4AMINO6CHLORO2DIMETHYLAMINO	172.6169	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE4AMINO6CHLORO2METHYLAMINO	158.5901	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE4AMINO6METHYL5METHYLAMINO2METHYL THIO	184.2586	-120	0	0	2	0		
PYRIMIDINE4CHLORO26BISMETHYLAMINO	172.6169	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE4CHLORO2DIMETHYLAMINO6METHYLAMIN O	186.6437	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE4CHLORO36DIHYDRO6IMINO3METHYL2MET HYLAMINO	172.6169	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE4CHLORO6DIMETHYLAMINO2METHYLAMIN O	186.6437	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE4DIETHOXYMETHYL6HYDROXY	198.2212	-221	0	0			4	1.44
PYRIMIDINE4HYDROXY26DIMETHYL	124.142	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE4HYDROXY2METHOXY6METHYL	140.1414	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE4BUTYL26DIMETHYL	179.2644	-145	0	0			5	2.11
PYRIMIDINE4IPENTYLAMINO26DIMETHYL	193.2912	-166	0	5			5	1.78
PYRIMIDINE5AMINO2CHLORO4METHYL6METHYLAMINO	172.6169	-95	0	0	1	0		
PYRIMIDINE5AMINO2METHYL4METHYLAMINO6METHYL THIO	184.2586	-120	0	0	2	0		
PYRIMIDINE5BUTYL4HYDROXY6METHYLTHIO	198.2824	-191	0	5				
PYRIMIDINE5CARBAMOYL46DIMETHYL2METHYLAMINO	180.209	-87	0	8	2	0	4	2.02

表 58

PYRIMIDINE5CARBAMOYL4METHYL2METHYLAMINO	166.1822	-95	0	0	2	0		
PYRIMIDINE6CHLORO12DIHYDRO2IMINO1METHYL4MET HYLAMINO	172.6169	-95	0	0	1	0		
QUINAZOLINE2TBUTYL34DIHYDRO4HYDROXY	204.2712	-106	0	14	2	0		
QUINOLINETRANSDECAHYDRO4CHLORO2METHYL	187.7119	-75	0	20	0	0		
RA81914	316.3992	-100	0	20	4	0		
RAUWOLFINE	314.4266	-94	0	26	3	0		
SAMPIRTINE	217.2453	-125	0	20	2	0		
SECBUMETON	225.293	-166	0	5		5	1.5	
SELAGINE	242.32	-81	0	14	0	0		
SIMAZINE2CYCLOBUTYLAMINEANALOG	227.6961	-140	0	5		5	1.1	
SIMAZINE2CYCLOPROPYLAMINEANALOG	213.6693	-116	0	29	4	0		
SIMAZINE2CYCLOPROPYLMETHYLAMINEANALOG	227.6961	-171	0	0		5	1.32	
STRIAZINE2METHYL4METHYLAMINO6TRICHLOROMETH YL	241.5071	-120	0	0	1	0		
SYMTRIAZINE2DIETHYLAMINO4IPROPYLAMINO6METHO XY	239.3198	-171	0	0		5	1.18	
TARTARICACIDDIETHYLESTER	206.195	-201	0	20		4	1.81	
TERBUMETON	225.293	-128	0	17	5	0		
TETRAHYDROPYRAN24DIONE31ETHOXYIMINOBTYL66	309.4046	-130	0	41	6	0		
SPIRO4METHYLCYCLOHEXYL	208.2806	-115	0	56	3	0		
THIAZOLO54DPYRIMIDINE7AMINO5BUTYL	206.305	-120	0	0	1	0		
TIQUINAMIDE	197.17306	-72	0	23	1	0		
TOLDIMFOS	307.0426	-124	0	47	10	1		
TRIBUTYL TINHYDROXIDE2	234.2054	-192	0	29		4	1.56	
TRIMETHYLCITRATE	195.2176	-171	0	0		4	1.46	
TYROSINEMETHYLESTER	194.2328	-120	0	0	4	0		
UREA1ETHYL10ANISYL	192.2602	-131	0	14	4	0		
UREA1PROPYL1MTOLYL	178.2334	-116	0	29	4	0		
UREA1PROPYL1PHENYL								



EXAMPLE 7

LBD 欠失変異体 (LBD deletion mutant) による活性低下

Mammalian Two Hybrid レポーター系において、Nor1 の LBD 領域を完全に欠失させた遺伝子を導入したところ、prostaglandin A2 による転写活性は顕著に抑制された (図 7)。したがって、prostaglandin A2 は実際にこれらの核内受容体の LBD 領域に作用して働いていることが示唆された。

EXAMPLE 8

ビアコアによる PGA 誘導体の Nor1 への結合の証明

Mammalian Two Hybrid レポーター系において明らかになった、Nor1 に対する PGA 誘導体のリガンド結合活性を完全証明するために、Nor1 の GST-LBD を大腸菌で発現させ精製した。ビアコア S51 を用い、GST との比較対照のもと、Nor1 の LBD に PGA1、PGA2 が結合している様子を捉えることができた (図 8)。レポーターで活性のなかったネガティブコントロール化合物の 13,14-dihydro-15-keto-PGA2 では LBD に結合しなかった。

EXAMPLE 9

アトピー性皮膚炎の、治療による寛解期に末梢血好酸球でこのようなアポトーティックな性格が示唆されるような遺伝子が亢進しているのは、末梢血好酸球数の減少とよく対応しており、この遺伝子の発現誘導は治療効果と相関する可能性が高いと考えられる。そこで、どのような刺激でこの遺伝子が好酸球から発現されるかを *in vitro* で調べた。

健常人から末梢血好酸球を大量に採取し、シャーレでの活性化を抑えて浮遊培養させ、IL-5 や IL-4 などのサイトカイン刺激で活性化させたが、Nor1 の誘導はみられなかった。それに対し、好酸球に特異的な細胞内経路でアポトーシスを誘導させ、喘息などの治療薬として可能性があることから最近注目されている好酸球 CD30 に対するアゴニスト活性をもった抗 CD30 抗体で、細胞をアポトーシス刺激すると、1-3 時間の処理の間に培養末梢血好酸球中で Nor1 が劇的に誘導されることが明らかになった (表 5.9、図 9)。以下の表 5.9 は、ヒト末梢血好酸球のアポトーシス誘導についてまとめたものである。

表 5.9  
ヒト末梢血好酸球のアポトーシス誘導

	Annexin V 陽性細胞 (%)
新鮮	4.0
対照	2.30

抗-CD30 抗体 抗-Fas 抗体	1 時間	9.20 5.20
対照 抗-CD30 抗体 抗-Fas 抗体	3 時間	4.50 20.00 13.80
対照 抗-CD30 抗体 抗-Fas 抗体	24 時間	11.70 63.00 31.20

抗 Fas 抗体では、抗 CD30 抗体より反応が遅いながらアポトーシスが起こるにも関わらず、Nor1 の誘導がかからなかったので、これまでとは違った好酸球特異的アポトーシス経路の可能性はある。これらの現象（アポトーシス誘導及びNor1 の発現誘導）は、好酸球特異的細胞株である AML14.3D10 を抗 CD30 抗体で処理したときも同様に観察された（図 10、11）。

この、好酸球を特異的に細胞死に導く経路を、Nor1 の機能の増強を通じて促進することは、喘息のみでなく、本発明者らの調べたアトピー性皮膚炎も含めた種々のアレルギー疾患の治療に繋がる可能性が高い。本発明者らの意図する治療戦略の一例を図 12 に示す。

#### EXAMPLE 10

##### トランスジェニック (TG) マウスの確立

ヒトNor1 遺伝子をアクチンプロモーターで導入したTGマウスの確立に成功した（図 13）。このマウスは、体重が野生株の半分しかなく、胸腺、脾臓の萎縮が観察された。脾臓細胞数が減少し、その機能も低下していた。Nor1 を介したアレルギー疾患解析の動物モデルとして使用できる。

What is claimed is:

1. 次の工程を含む、アレルギー性疾患の検査方法。
  - (a) 被検者の好酸球細胞における、NOR-1受容体タンパク質、または前記タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを測定する工程
  - (b) 健常者の好酸球細胞における前記タンパク質または遺伝子の発現レベルと比較する工程
2. 遺伝子の発現レベルを、cDNAのPCRによって測定する、請求項1に記載の検査方法。
3. アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項1または2に記載の検査方法。
4. NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドまたはその相補鎖に相補的な塩基配列を有する少なくとも15塩基の長さを有するオリゴヌクレオチドからなる、アレルギー性疾患検査用試薬。
5. 次の工程(1)および(2)を含む、候補化合物が下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。
  - (1) 下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドを発現する細胞に候補化合物を接触させる工程
  - (a) NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
  - (b) NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (2) 前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを測定する工程、
6. 細胞が株化白血球細胞である請求項5に記載の方法。
7. 次の工程(1)および(2)を含む、候補化合物が下記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。
  - (a) NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。
  - (b) NOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質をコードするポリヌクレオチド。
- (1) 被検動物に候補化合物を投与する工程、および
- (2) 被検動物の好酸球細胞における前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現強度を測定する工程、

8. 請求項5～7のいずれかに記載の方法によって、前記発現レベルに与える影響を検出し、対照と比較して前記発現レベルを上昇させる化合物を選択する工程を含む、前記(a)または(b)に記載のポリヌクレオチドの発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法。
- 5 9. 次の工程(1)および(2)を含む、候補化合物がNOR-1受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドの発現レベルに与える影響を検出する方法。
- (1) NOR-1受容体タンパク質をコードする遺伝子の転写調節領域と、レポーター遺伝子とが機能的に結合した構造を有するDNAを含む細胞または細胞抽出液と、候補化合物を接触させる工程、および
- 10 (2) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程、
10. 請求項9に記載の方法によって、候補化合物の前記活性に与える影響を検出し、対照と比較して前記活性を上昇させる化合物を選択する工程を含む、NOR-1受容体タンパク質をコードする遺伝子の発現レベルを上昇させる化合物のスクリーニング方法。
- 15 11. 次の工程(1)～(3)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法。
- (1) NOR-1受容体タンパク質と被験化合物を接触させる工程
- (2) NOR-1受容体タンパク質と被験化合物との結合活性を測定する工程
- (3) NOR-1受容体タンパク質と結合する化合物を選択する工程
- 20 12. 次の工程(1)～(4)を含む、アレルギー性疾患治療薬のための候補化合物をスクリーニングする方法。
- (1) NOR-1受容体タンパク質または該タンパク質のリガンド結合領域と転写調節領域結合タンパク質との融合タンパク質を発現し得るDNA、および該転写調節領域結合タンパク質の結合するDNA配列の下流にレポーター遺伝子が機
- 25 能的に結合した構造を有するDNA、を導入した細胞を提供する工程
- (2) 前記細胞と被験化合物を接触させる工程
- (3) 前記レポーター遺伝子の活性を測定する工程
- (4) 前記活性を変化させる化合物を選択する工程
- 30 13. 請求項10～12のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物を有効成分として含有する、アレルギー性疾患治療薬。
14. 請求項10～12のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができるシクロペンテン構造を有するプロスタグランジンを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬。
- 35 15. NOR-1受容体のリガンドを有効成分として含有するアレルギー性疾患治療薬。

- 1 6. NOR-1 受容体のリガンドが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンである、請求項 1 5 に記載のアレルギー性疾患治療薬。
- 1 7. シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、プロスタグランジン A<sub>2</sub>、プロスタグランジン A<sub>1</sub>、16, 16-ジメチル プロスタグランジン A<sub>2</sub>、15(R)-1  
5 5-メチル プロスタグランジン A<sub>2</sub>、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン A<sub>2</sub>、17-フェニル トリノール プロスタグランジン A<sub>2</sub>、15-デオキシ-デルタ 1  
2, 14-プロスタグランジン J<sub>2</sub>、および 8-イソ プロスタグランジン A<sub>1</sub> からなる群より選択される、請求項 1 6 に記載のアレルギー性疾患治療薬。
- 1 8. NOR-1 受容体のリガンドが、表 1 4 ~ 5 8 に掲載されたいずれかの化合物である、請求項 1 5 に記載のアレルギー性疾患治療薬。  
10
- 1 9. アレルギー性疾患がアトピー性皮膚炎である、請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれかに記載の治療薬。
- 2 0. 下記の (a) または (b) に記載のポリヌクレオチドの好酸球細胞における発現強度を低下させたトランスジェニック非ヒト脊椎動物からなるアレルギー  
15 性疾患モデル動物。  
(a) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチド。  
(b) NOR-1 受容体タンパク質をコードするポリヌクレオチドとストリンジェントな条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドであって、アトピー性皮膚炎の寛解期に好酸球の減少に伴って好酸球において発現が増加するタンパク質  
20 をコードするポリヌクレオチド。
- 2 1. トランスジェニック動物が、ノックアウト動物である請求項 2 0 に記載のモデル動物。
- 2 2. 細胞における NOR-1 受容体タンパク質を活性化させることを特徴とする、細胞のアポトーシス誘導方法。
- 25 2 3. 請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンと、細胞を接触させる工程を含む、請求項 2 2 に記載のアポトーシス誘導方法。
- 2 4. 細胞が好酸球細胞である、請求項 2 2 または 2 3 に記載のアポトーシス誘導方法。
- 30 2 5. 請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれかに記載のスクリーニング方法によって得ることができる化合物またはシクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンを含む、アポトーシス誘導剤。
- 2 6. NOR-1 受容体のリガンドを有効成分として含有するアポトーシス誘導剤。
- 2 7. NOR-1 受容体のリガンドが、シクロペンテノン構造を有するプロスタ  
35 ランジンである、請求項 2 6 に記載のアポトーシス誘導剤。

28. シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、シクロペンテノン構造を有するプロスタグランジンが、プロスタグランジン  $A_2$ 、プロスタグランジン  $A_1$ 、16, 16-ジメチル プロスタグランジン  $A_2$ 、15(R)-15-メチル プロスタグランジン  $A_2$ 、16-フェノキシ テトラノール プロスタグランジン  $A_2$ 、17-フェニル トリノール プロスタグランジン  $A_2$ 、15-デオキシ-デルタ 12, 14-プロスタグランジン  $J_2$ 、および 8-イソ プロスタグランジン  $A_1$  からなる群より選択される、請求項 27 に記載のアポトーシス誘導剤。
- 5 29. NOR-1 受容体のリガンドが、表 14~58 に掲載されたいずれかの化合物である、請求項 26 に記載のアポトーシス誘導剤。
- 10 30. 好酸球 CD30 受容体のリガンドを含む、NOR-1 遺伝子発現誘導剤。

ABSTRACT

- 5      ディファレンシャルディスプレイ法により、アトピー性皮膚炎患者の増悪期と寛解期に採取した好酸球において発現に差の見られる遺伝子を探索した。その結果、好酸球の減少を伴う寛解期にある患者の好酸球において、有意に発現が上昇している NO R-1 (MINOR) 遺伝子を同定することに成功した。本発明者らは、該遺伝子をアレルギー性疾患の検査、および治療薬候補化合物のスクリーニングに使用できることを見出した。